



Tesis Doctoral

Mario Luengo Díaz

Análisis genómicos y funcionales para
determinar el papel de protooncogenes en el
desarrollo embrionario de vertebrados

Director: José Luís Gómez Skarmeta

Tutor: Andrés Garzón Villar

Centro Andaluz de Biología del Desarrollo

Universidad Pablo de Olavide/CSIC.

Introducción

1. Desarrollo embrionario de vertebrados y expresión génica de genes de desarrollo.

El desarrollo embrionario es el conjunto de procesos biológicos que ocurren de forma ordenada y secuencial para dar lugar a un organismo pluricelular completo, a partir de una única célula o cigoto. La correcta formación del plan corporal y la generación y organización de los diferentes tejidos y órganos presentes en vertebrados requiere del control eficiente de los procesos de proliferación, diferenciación, migración y apoptosis. Todas las células somáticas del embrión derivan del óvulo fecundado mediante divisiones sucesivas de forma que, con raras excepciones, todas contienen una información genética idéntica, la misma presente en el cigoto (Fig. i1). De ahí que las diferencias entre células deben ser generadas por diferencias en la actividad génica que lleva a la síntesis de un conjunto diferente de proteínas. Los diferentes patrones de expresión espacio-temporal de un conjunto de genes, denominados genes de desarrollo, controlan los procesos por los cuales diferentes células adquieren morfologías y propiedades funcionales únicas en los diferentes tejidos.

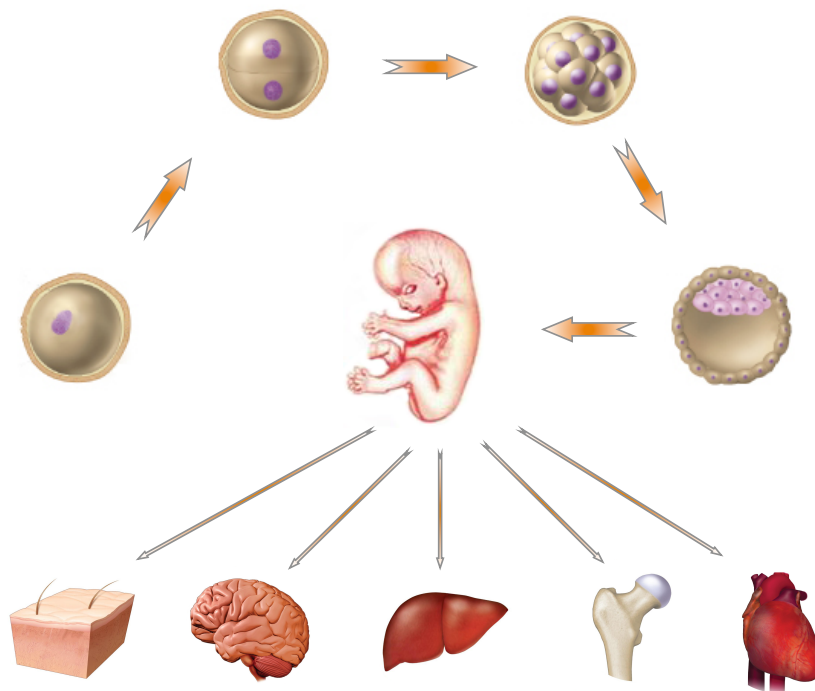


Fig. i1: Desarrollo y diferenciación celular. Todas las células del cuerpo proceden del óvulo fecundado o cigoto. A partir de esta célula original, mediante procesos de proliferación y diferenciación altamente regulados, son generados todos los tejidos y órganos.

Los genes de desarrollo codifican proteínas como factores de transcripción, factores de crecimiento, receptores y proteínas de señalización involucrados en la regulación de los procesos celulares. Debido a que el embrión en desarrollo es un ser vivo que necesita mantener su homeostasis a la vez que genera nuevas estructuras corporales, algunos de estos genes codificantes de moléculas de señalización y receptores tienen una expresión constitutiva y están activos durante toda la vida del organismo. Otros genes de desarrollo, sin embargo, solamente se encuentran activos en determinadas etapas del desarrollo.

La organogénesis en vertebrados constituye una serie de complejos procesos de desarrollo entre los que se ven implicados mecanismos de diferenciación celular y una rápida proliferación de células pluripotentes que conducen a la formación de tejidos diferenciados y altamente organizados. Estos procesos son modulados por una serie de glicoproteínas de la matriz extracelular (Matrisian y Hogan, 1990) y proteínas receptoras para éstas, como es el caso de las integrinas (Pigot y Power, 1993), enzimas remodeladoras de esta matriz y sus inhibidores (Kleiner y Stetler-Stevenson, 1993), moléculas de adhesión celular (Buxton y Magee, 1992), proteínas del citoesqueleto (Kries y Vale, 1993), factores de crecimiento u hormonas y sus receptores (Adamson, 1993), proteínas de unión al ADN o factores de transcripción (Latchman, 1993) y ciertos protooncogenes (Klein, 1993). Los protooncogenes son genes reguladores de la proliferación celular y por tanto del crecimiento, que se expresan normalmente en multitud de células, pero que pueden potencialmente adquirir capacidades de inductor tumoral debido a mutaciones puntuales, amplificaciones, translocaciones o cualquier otro tipo de mutación. Hasta el momento han sido identificados multitud de genes capaces de inducir este tipo de fenotipos neoplásicos. Éstos muestran un alto grado de conservación evolutiva, lo que sugiere que poseen funciones esenciales conservadas a lo largo de la evolución (Stelzner, 1987).

Debido a la necesidad del control eficiente de los procesos de diferenciación y proliferación para que pueda llevarse a cabo un correcto desarrollo embrionario y una correcta homeostasis en el adulto, la expresión de los genes de desarrollo está altamente regulada temporal, espacial y cuantitativamente durante toda la vida de un organismo (Fig. i2).

1.1 Expresión génica diferencial durante el desarrollo: regulación transcripcional.

El control de la expresión de los genes de desarrollo puede ser ejercido a nivel transcripcional, mediante la regulación del conjunto de genes que son transcritos. Además, la actividad de estos genes puede ser regulada a nivel postranscripcional, mediante el procesamiento y la selección de los ARN que pasan al citoplasma para ser traducidos a proteína y a nivel postraducciona, mediante el control del conjunto de proteínas que se encuentran activas en un momento dado.

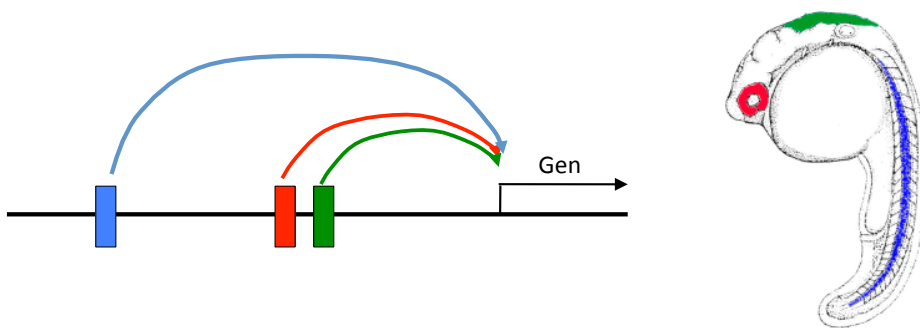


Fig. i2: Genes de desarrollo. Representación esquemática del paisaje regulador de un gen de desarrollo. La expresión tejido-específica en la retina (rojo), el cerebro posterior (verde) y en la notocorda (azul) es dirigida por tres enhancers diferentes que actúan sobre el promotor del gen.

La regulación de la expresión génica a nivel transcripcional está orquestada por la interacción entre proteínas nucleares denominadas factores de transcripción, promotores y elementos cis-reguladores (ECR). Los ECR son secuencias de ADN no codificantes, localizadas en intrones o en regiones intergénicas, capaces de regular la tasa de transcripción de un gen mediante el control de la actividad de su promotor, incluso encontrándose éstos situados a grandes distancias en el genoma. Entre estos ECR podemos encontrar elementos que son capaces de activar (*enhancers*) (Khoury y cols., 1983) o reprimir (silenciadores) (Brand y cols., 1985) la transcripción de sus genes diana. Además, los aisladores constituyen un tercer tipo de ECR, cuya función es evitar la interacción entre enhancers y promotores, protegiendo así a los genes de la utilización errónea de información regulatoria presente en el entorno genómico y perteneciente a otros genes (Moltó y cols., 2009; West y cols., 2002). La regulación transcripcional llevada a cabo por

factores de transcripción, promotores y ECR es un proceso compuesto a su vez de varios eventos como son: (1) la asociación de los factores de transcripción con sus sitios de unión al ADN específicos situados en ECR, (2) el reclutamiento de otros factores correguladores necesarios para modificar la estructura de la cromatina y facilitar la interacción entre enhancers y promotores, (3) la regulación de la actividad de la ARN polimerasa II sobre los promotores y (4) la finalización o la atenuación de la señal dependiente de la actividad de los factores de transcripción (Acevedo y cols., 2004; Glass y cols., 2000; Kraus y cols., 2002; McKenna y cols., 1999; Metivier y cols., 2006).

Hasta el momento, se han descrito multitud de ECR con actividad enhancer que presentan un alto grado de conservación entre especies (Pennacchio y cols., 2006; De la Calle-Mustienes y cols., 2005; Nobrega y cols., 2003; Pennacchio y cols., 2001; Visel y cols., 2007; Visel y cols., 2008). De hecho, el análisis filogenético o de comparación de genomas, rastreando de entre todas las secuencias no codificantes, aquellas que presentan altos niveles de conservación, a lo que se le denomina “huella filogenética”, ha sido un método ampliamente utilizado para identificar ECR.

Además, la detección de ECR con actividad enhancer puede ser llevada a cabo mediante el uso de unas construcciones denominadas “enhancer trap” compuestas por un promotor mínimo, capaz de dirigir expresión génica en respuesta a la presencia de enhancers

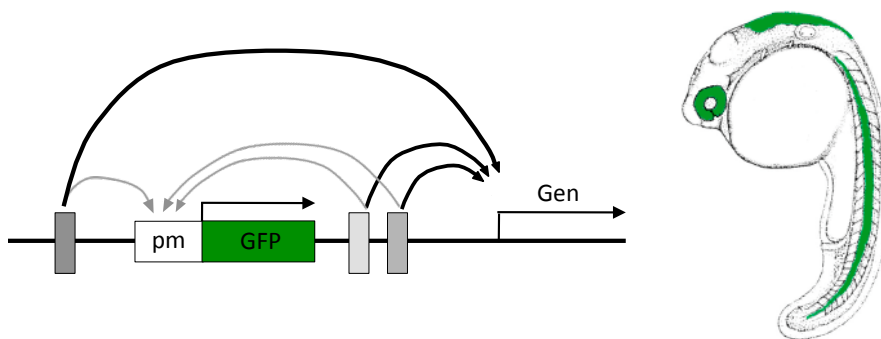


Fig. i3: Enhancer trap. Representación esquemática del punto de inserción de un enhancer trap compuesto por un promotor mínimo (pm) y la proteína fluorescente verde (GFP) como gen reportero. Los enhancers cercanos al punto de inserción (cajas grises) son capaces de activar la expresión de GFP en los mismos tejidos (verde) donde dirigen la expresión del gen al que controlan, pudiendo así ser detectados.

cercanos, y un gen reportero como la proteína fluorescente verde (Green Fluorescent Protein, GFP). Estas construcciones, tras ser insertadas en el genoma de un embrión mediante técnicas de transgénesis, son capaces de leer y poner de manifiesto la información regulatoria localizada en el entorno genómico del punto de inserción (Fig. i3).

Pero además de elementos ECR altamente conservados, la regulación transcripcional de los genes de desarrollo necesita de la actuación de numerosos elementos no conservados (Blow y cols., 2010) y que por tanto no pueden ser identificados mediante la huella filogenética.

Dependiendo del nivel de compactación de una región de la cromatina, esta estará en un estado más o menos favorable para la expresión génica. Todo el ADN presente en el núcleo está organizado alrededor de unidades estructurales llamadas nucleosomas, constituidas por un conjunto de proteínas denominadas histonas. Estas histonas forman octámeros compuestos de dos moléculas de cada una de las histonas H2a, H2b, H3 y H4. La histona H1, por su parte, se sitúa en el exterior de los nucleosomas uniéndolos unos a otros, contribuyendo así también a la correcta compactación de la cromatina (Fig. i4). El extremo N-terminal de las histonas presenta una alta conservación entre especies y puede ser objeto de modificaciones postraduccionales como metilación, ubiquitinación o acetilación, que tienen un efecto directo en la modulación de la compactación de la cromatina (Bannister y cols., 2011). Estudios recientes muestran que la presencia de trimetilación de la lisina 4 de la histona H3 (H3K4me3) indica la presencia de promotores y que la presencia de monometilación en la lisina 4 de la histona 3 (H3K4me1) y de acetilación de la lisina 27 de la histona 3 (H3K27ac) indican la presencia de enhancers (Creyghton y cols., 2010; Heintzman y cols., 2009; Heintzman y cols., 2007), (Fig. i4b), por lo que es posible utilizar los perfiles epigenéticos de metilación y acetilación para predecir la posible actividad cis-reguladora de secuencias de ADN independientemente del grado de conservación entre especies (Sakabe y Nobrega 2010).

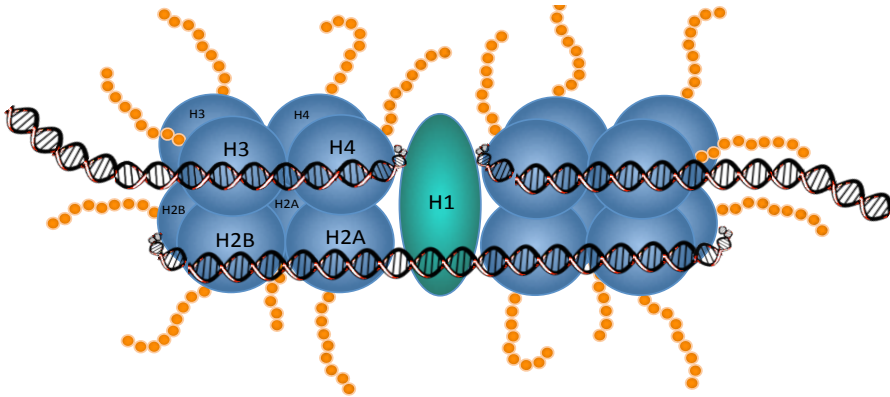
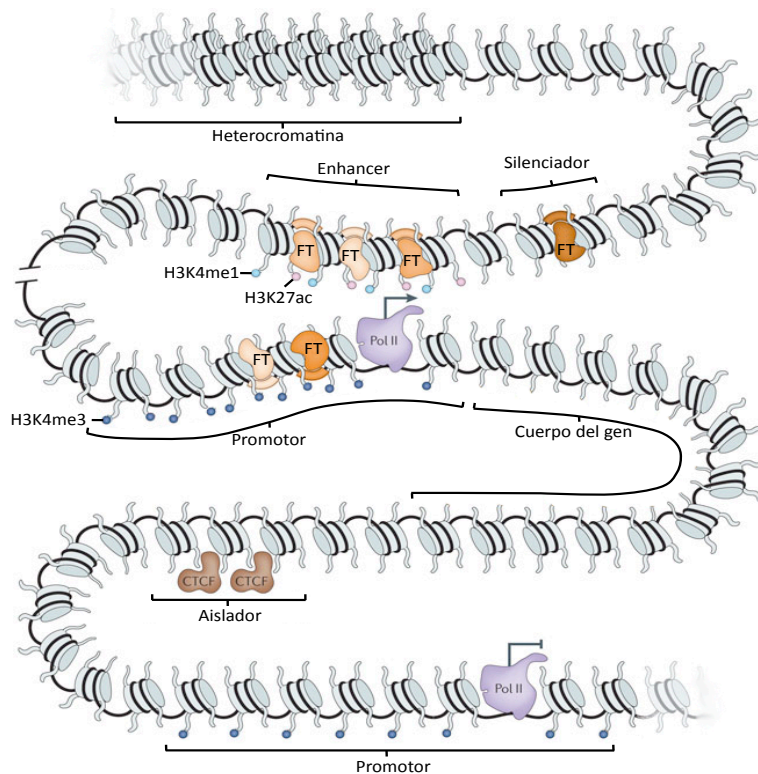
A**B**

Fig. i4: Nucleosomas y compactación de la cromatina. A: Representación de la organización de dos nucleosomas compuestos por dos moléculas de cada una de las histonas H2a, H2b, H3 y H4, presentando residuos susceptibles de sufrir modificaciones epigenéticas. La histona H1 queda situada en el exterior de los nucleosomas uniéndolos unos a otros. B: La presencia de modificaciones epigenéticas (H3H4me1, H3K4me3 y H3K27ac), que determinan el grado de compactación de la cromatina, hacen accesibles ciertas zonas del genoma a diferentes factores de transcripción (FT). Éstos se unen a distintas secuencias no codificantes como silenciadores, enhancers, aisladores (asociados a la proteína CTCF) y promotores, para regular la actividad transcripcional de la ARN polimerasa II (Pol II). Adaptado de Gallego y cols., 2012.

2. Vía de señalización del ácido retinoico en el desarrollo.

EL ácido retinoico (AR) es un metabolito derivado de la Vitamina A (todo-trans-Retinol) de carácter lipofílico que afecta a la transcripción génica y modula una amplia variedad de procesos biológicos como la proliferación, la diferenciación o la apoptosis. Trabajos previos utilizando aves y roedores como animales modelo mostraron que un déficit materno de vitamina A afecta al embrión y al feto, dando lugar a un amplio espectro de defectos en el desarrollo (Gale y cols., 1999; Wilson y cols., 1953). Hace más de 25 años, se pudo esclarecer la base molecular de las acciones de la Vitamina A cuando se demostró que su metabolito activo, actúa como ligando de proteínas nucleares receptoras denominadas receptores del ácido retinoico (RAR) que actúan como factores de transcripción y cuya actividad es modificada pasando de actuar como potenciales represores a comportarse como activadores transcripcionales. Actualmente también se conoce otro tipo de receptores del ácido retinoico llamados RXR y que actúan formando heterodímeros RAR-RXR. Las primeras funciones conocidas del AR durante la embriogénesis fueron inferidas mediante el estudio sus efectos teratogénicos al ponerse de manifiesto que la administración de altas dosis de RA interfería con el proceso normal de desarrollo. Estos estudios fueron llevados a cabo en una amplia variedad de especies incluyendo anfibios, peces, aves y roedores (Avantaggiato y cols., 1996; Durston y cols., 1989). Estudios de inactivación génica confirmaron más tarde las funciones cruciales de los RAR en el desarrollo de ratón (Mark y cols., 2009).

Hasta el momento han sido identificados numerosos genes diana de los receptores de AR (Balmer y Blomhoff, 2002) incluyendo genes pertenecientes a la ruta de señalización del ácido retinoico como *Rarb*, *Crbp1/2* (*Rbp1/2*), *Crabp1/2* y *Cyp26a1*. Estos genes cuentan con secuencias en su entorno regulatorio denominadas elementos de respuesta a ácido retinoico (RA-responsive elements, RAREs) que actúan como sitio de unión de los receptores de AR (Fig. i5) y cuya existencia es necesaria para que los niveles de expresión de un gen sean regulados por la vía de señalización del ácido retinoico (Rudert y Gronemeyer, 1993). Durante el último cuarto de siglo, se han identificado más de 500 genes regulados por el ácido retinoico. En algunos casos, este control es directo y está mediado por la unión al ADN de heterodímeros RAR-RXR unidos a AR, mientras que en otros, este control es indirecto y es llevado a cabo por la acción intermediaria de otros elementos, principalmente factores de transcripción.

Durante el desarrollo embrionario, el ácido retinoico regula multitud de procesos biológicos como la formación de las capas germinales, la generación de los ejes corporales y la neurogénesis, además de estar directamente implicado en la organogénesis y el desarrollo de los arcos branquiales, el páncreas, los pulmones o los ojos.

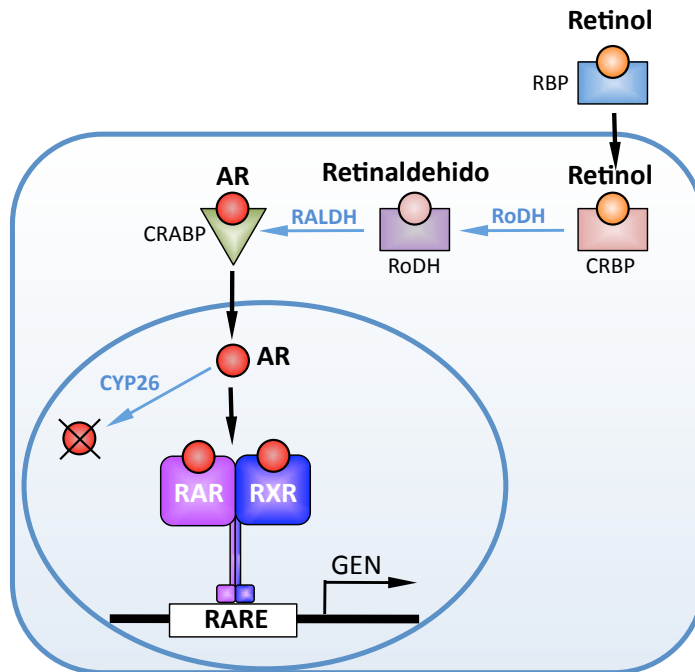


Fig. i5: Vía de señalización del Ácido Retinoico. El retinol es captado del flujo sanguíneo y unido a la proteína RBP que lo introduce en la célula. Una vez en el citoplasma, el retinol se une a la proteína transportadora citoplasmática CRBP. La enzima RoDH (retinol deshidrogenasa) transforma el retinol en retinaldehído y este más tarde es transformado en AR (ácido retinoico) por la acción de la enzima RALDH (retinaldehído deshidrogenasa). El AR puede ser entonces captado por la proteína transportadora CRABP e introducido en el núcleo, donde se une a los receptores RAR y RXR que, tras dimerizar, se unen a los elementos de respuesta al ácido retinoico (RARE) y activan la transcripción génica. La proteína CYP26 tiene como función la degradación del ácido retinoico, regulando así su disponibilidad.

3. Organogénesis.

3.1 Desarrollo de los arcos branquiales y sus derivados.

Los arcos branquiales son unas estructuras anatómicas a modo de abultamientos separados por hendiduras que se encuentran presentes a ambos lados de la faringe de los embriones de cordados. En algunos vertebrados como las lampreas, estas estructuras permanecen funcionales en el adulto, mientras que sólo están presentes de manera transitoria durante el desarrollo embrionario en otros vertebrados. Los arcos branquiales están espaciados entre si por unas estructuras denominadas sacos faríngeos. El correcto desarrollo de los arcos branquiales y los sacos faríngeos es crucial ya que dan lugar a la mayoría de complejas estructuras que componen el cráneo, la cara y el cuello de los vertebrados (Tabla i1).

Arco branquial	Estructura derivada
1º (Mandibular)	Nervio trigémino
	Hueso mandibular
	Músculos de la masticación
	Tensor del timpano
	Tensor del velo del paladar
	Martillo
	Yunque
	Ligamento anterior del martillo
	Ligamento eseno mandibular
2º (Hiodeo)	Nervio facial
	Músculos de la expresión facial
	Estribo
	Estilo hiodeo
	Apófisis estiloides
	Asta menor del hiodeo
	Ligamento estilohiodeo
3º	Nervio glossofaríngeo
	Estilo faríngeo
	Asta mayor del hiodeo
4º y 6º	Rama faríngea superior del vago
	Rama laríngea recurrente del vago
	Cricotirodeo
	Elevador del velo del paladar
	Constrictores de la faringe
	Músculos estriados del esófago
	Cartílagos tiroide, cricoides, aritenoides, corniculado y cuneiforme

Tabla i1: Estructuras anatómicas derivadas de los arcos branquiales.

El pez cebra (*Danio rerio*), especie modelo utilizada para la realización de esta tesis doctoral, presenta al final de su desarrollo un total de 7 arcos branquiales y 6 sacos faríngeos. El desarrollo de los arcos branquiales es un complejo proceso en el que están involucrados tejidos de las tres capas germinales. Así, los arcos branquiales están integrados por células derivadas del ectodermo (epidermis y células de la cresta neural), del mesodermo (células musculares y vasos sanguíneos) y del endodermo (sacos faríngeos), (Fig. i6a). Las células de la cresta neural (CCN) presentes en los arcos branquiales provienen de la migración de éstas a lo largo de tres bandas diferenciadas desde los rombómeros del cerebro posterior hacia el primer arco branquial o arco mandibular (primera banda de migración), el segundo arco branquial o arco hioideo (segunda banda de migración) y hacia los cinco arcos branquiales restantes (tercera banda de migración), (Fig. i6b).

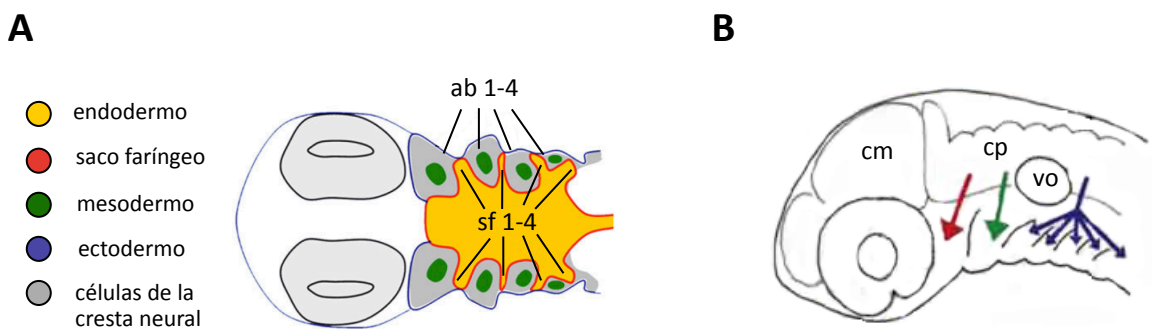


Fig. i6: Estructura de los arcos branquiales en pez cebra y migración de las CCN. Representación esquemática de la estructura de los arcos branquiales de pez cebra, donde se muestran los cuatro primeros arcos branquiales (ab) y sacos faríngeos (sf), (A). Adaptado de Piotrowski y Nüsslein-Volhard, 2000. Las células de la cresta neural alcanzan los arcos branquiales desde el cerebro posterior (cp) a través de tres bandas de migración (flechas roja, verde y azul), (B). (cm: cerebro medio; vo: vesícula ótica). Adaptado de Knight y Schilling, 2006.

Papel de las CCN en el desarrollo de los arcos branquiales.

La migración de las CCN en tres bandas parece ser esencial para la organización de los arcos branquiales. Experimentos llevados a cabo en pollo han demostrado que las células de estas tres bandas nunca se mezclan, incluso en aquellos elementos anatómicos compuestos por

células provenientes de más de una de estas bandas (Kontges y Lumsden, 1996). En esta misma dirección apuntan experimentos realizados en aves y anfibios que muestran que si se realiza un trasplante de células de la cresta neural del primer arco branquial, tras migrar a lo largo de la primera banda de migración, y se las deposita en una región más caudal como es el segundo arco branquial, éstas son aún capaces de formar mandíbulas y otras estructuras típicamente derivadas del primer arco branquial de manera ectópica (D'amico-Martel y Noden, 1983). Estos resultados son de enorme importancia ya que sugieren que las CCN llevan información posicional esencial para establecer el patrón de formación de los arcos branquiales, por lo que los mecanismos involucrados en la organización de la segregación de las diferentes bandas de migración podrían estar jugando un papel central en el desarrollo de los arcos branquiales y sus estructuras y órganos derivados.

El endodermo juega un papel crucial en el desarrollo de los arcos branquiales.

El primer elemento diferenciable que se forma en el desarrollo de los arcos branquiales son unos abultamientos del endodermo que, al crecer, llegan a contactar con el ectodermo y que son denominados sacos faríngeos. En el pez cebra, el mutante *vgo* muestra una severa desorganización del cartílago derivado de las CCN, pudiendo presentar arcos branquiales fusionados entre sí, e incluso pudiendo no llegar a formarse en el caso de los arcos más posteriores. En este mutante, la migración de las CCN se da correctamente a lo largo de las tres bandas de migración pero el endodermo sufre fallos en el proceso de segmentación y los sacos faríngeos no se forman, dando lugar a la fusión o pérdida de arcos branquiales. Además, mediante experimentos de ablación en embriones de pollo, se ha podido demostrar que los arcos branquiales llegan a formarse tras eliminar el tubo neural de embriones en un estadio previo a la formación de las crestas neurales (Veitch y cols., 1999) y que distintos marcadores endodérmicos como *Bmp7*, *Fgf8* o *Pax1*, con una expresión diferencial e involucrados en la regionalización antero-posterior y próximo-distal de los arcos branquiales, no cambian sus patrones de expresión en ausencia de CCN (Graham, 2001), lo que indica la necesidad de la correcta formación y regionalización del endodermo faríngeo a demás de la correcta formación y migración de las células de la cresta neural para el normal desarrollo de los arcos branquiales y sus estructuras derivadas.

A pesar del papel central que tienen tanto las CCN como el endodermo faríngeo en la inducción y regionalización de los arcos branquiales, también existen evidencias de la intervención de señales procedentes tanto del mesodermo como del ectodermo en el desarrollo de los arcos branquiales y los elementos anatómicos a los que dan lugar. En sentido apuntan las evidencias que demuestran que, tras trasplantar CCN del segundo arco branquial, caracterizadas por la expresión del gen *Hoxb1*, al primer arco, los niveles de este marcador en estas células sólo se mantienen tras el trasplante, en el caso de que las CCN fueran trasplantadas junto con las células mesodérmicas situadas a su alrededor en su emplazamiento original (Trainor y Krumlauf, 2000), lo que indica que el mesodermo tiene algún grado de responsabilidad en el mantenimiento de la identidad de las CCN del segundo arco branquial. En la misma línea apuntan experimentos en ratón que muestran como células del ectodermo oral que recubren el primer arco branquial, tienen entre sus funciones inducir la odontogénesis en el mesénquima de CCN subyacente (Tucker y Sharpe, 1999).

Funciones de la ruta de señalización del ácido retinoico en el desarrollo de los arcos branquiales.

En los últimos años se han publicado numerosos trabajos acerca del papel del AR en el desarrollo de estructuras como la placa neural, el cerebro anterior y posterior, los somitos o las extremidades. Así mismo, también existen numerosos estudios que evidencian la implicación de la vía de señalización del AR y la importancia del control fino de los niveles de ácido retinoico disponibles, en la formación de los arcos branquiales.

Así como la existencia de niveles suficientes de ácido retinoico es fundamental para la expresión de ciertos genes dependientes de esta vía de señalización en determinados tipos celulares, su degradación es también esencial para evitar la activación inapropiada de estos genes en otros tipos celulares. Por eso, la distribución y niveles de AR están altamente regulados por la síntesis a través de la acción de deshidrogenasas específicas (retinol deshidrogenasas o RDH y retinaldehído deshidrogenasas o RALDH) y por la degradación mediante la actuación de proteínas CYP26 (citocromo P450 subfamilia 26). El gen *Raldh2* se expresa en el mesénquima que rodea los arcos branquiales, desde el borde posterior del segundo arco branquial hasta el sexto, y en el endodermo que lo recubre. Ratones

mutantes para *Raldh2* presentan un desarrollo anormal de todas las estructuras derivadas de los arcos 3º, 4º y 6º incluyendo los sacos faríngeos (Niederreither y cols., 2003). El mismo fenotipo es producido por el tratamiento de embriones silvestres con BMS493 (un antagonista de las proteínas receptoras RAR) (Wendling y cols., 2000). Además, entre los genes que se expresan en la región de los arcos branquiales y que resultan afectados tanto en el mutante *Raldh2* como en los embriones tratados con BMS493, se encuentran los genes *Hoxa1* y *Hoxb1* que están bajo el control de elementos RARE.

En conjunto, todas estas evidencias confirman la importante implicación de la vía de señalización del ácido retinoico en la regulación de los genes relacionados con el desarrollo craneofacial en vertebrados.

3.2 Origen y desarrollo del páncreas.

El páncreas es un órgano glandular situado en la cavidad abdominal que cumple importantes funciones en el sistema digestivo y el sistema endocrino de los vertebrados. Es a la vez una glándula endocrina, que produce hormonas como insulina, glucagón, somatostatina y el polipéptido pancreático, y un órgano digestivo, que produce y secreta el jugo pancreático, que contiene enzimas digestivas que ayudan a la digestión y absorción de carbohidratos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos en el intestino delgado.

La función exocrina es llevada a cabo por células secretoras dispuestas en acinos repartidos por el parénquima pancreático (Fig. i7b). Estas células acinares producen el jugo pancreático que, en humanos, es drenado a través de una red de ductos que desembocan en el conducto pancreático o de Wirsung, que se comunica con el duodeno a través de la papila de Vater, o que desembocan en el conducto pancreático accesorio o de Santorini que se comunica con el duodeno a través de la papila menor (Fig. i7a). El jugo pancreático está formado por agua y bicarbonato, que neutraliza el pH ácido del quimo al llegar al duodeno, y por numerosas enzimas digestivas como lipasas, amilasas, proteasas, ribonucleasas y desoxirribonucleasas. Todas estas enzimas son producidas y secretadas en forma inactiva, pasando a activarse una vez que han llegado al duodeno.

Por otro lado, la función endocrina del páncreas es llevada a cabo por distintos tipos celulares (α , β , δ , ϵ y PP) encargados de producir y segregar diferentes tipos de hormonas y

dispuestos en humanos en estructuras llamadas islotes pancreáticos o de Langerhans (Fig. i7d) Así las células α producen glucagón, que tiene como función aumentar los niveles de glucemia y las células β producen insulina, destinada por el contrario a disminuir los niveles de glucosa en sangre y permitir la absorción y utilización de ésta por otras células del cuerpo. Por su parte, las células Δ producen somatostatina, que tiene como función la inhibición de la producción de insulina y glucagón y de la contracción del músculo liso del tubo digestivo y la vesícula biliar cuando la digestión ha finalizado, las células PP que

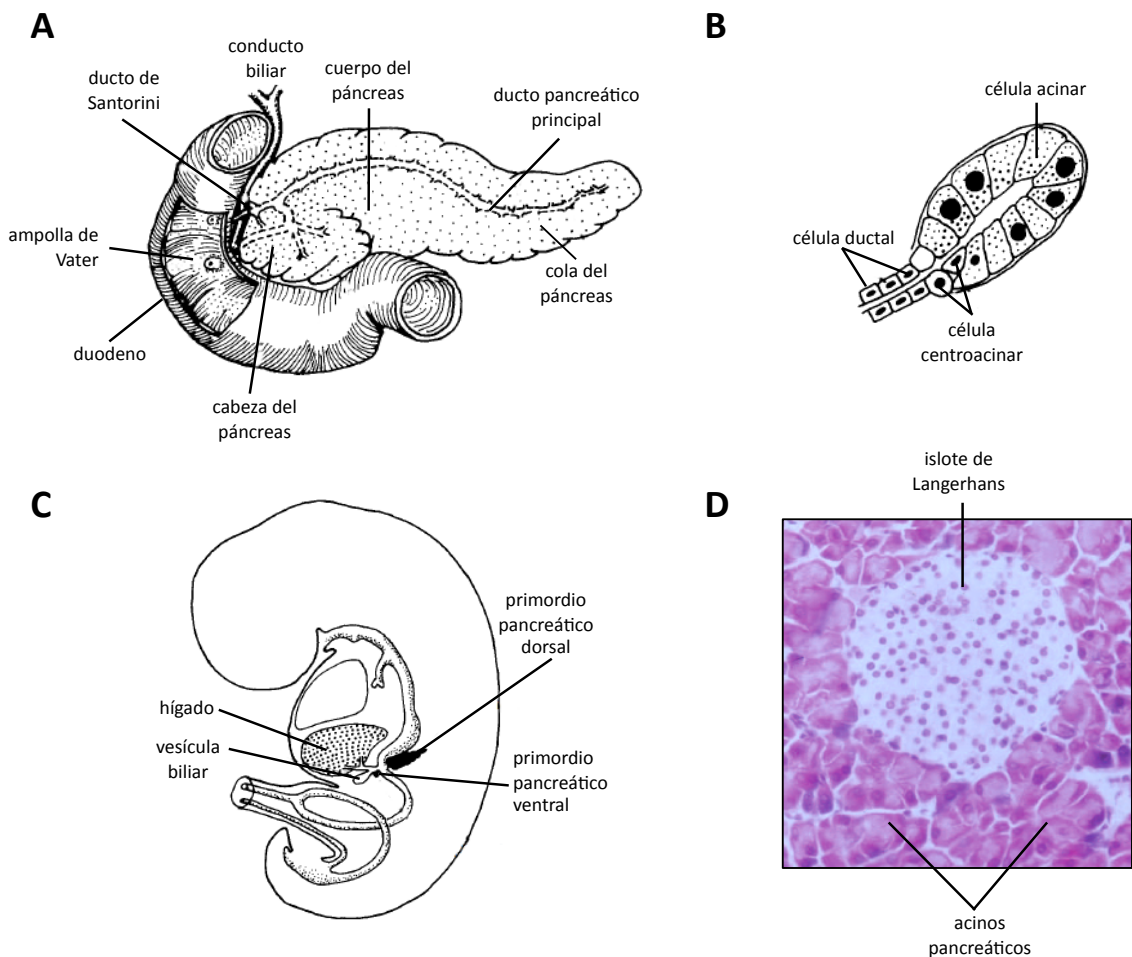


Fig. i7: Anatomía, histología y origen embrionario del páncreas. A: Representación de la anatomía del páncreas humano. B: Estructura y componentes celulares de un acino, la unidad funcional del páncreas exocrino. C: Localización de los primordios pancreáticos dorsal y ventral en un embrión humano de alrededor de 36 días de gestación. D: Sección histológica del páncreas humano adulto teñida con floxina. Modificado de Slack 1995.

segregan el polipéptido pancreático destinado a regular la secreción exocrina del páncreas y las células ϵ que producen ghrelina que tiene entre otras funciones la regulación de la ingesta y el peso corporal.

3.2.1 Organogénesis del páncreas.

La organogénesis del páncreas comienza con el desarrollo de dos primordios que surgen a partir del endodermo en las zonas dorsal y ventral del duodeno. El primordio pancreático ventral surge de la zona adyacente al divertículo hepático, mientras que el dorsal aparece en la cara opuesta del tubo digestivo (Fig. i7c). A pesar de que la aparición del primordio pancreático ventral ocurre algo después, su desarrollo es el mismo que el del primordio dorsal aunque un poco desplazado en el tiempo. A medida que ambos primordios crecen, éstos generan nuevas protuberancias que van conformando una estructura de conductos altamente ramificada (Spooner y cols., 1970). Posteriormente, a consecuencia de la posterior torsión del estómago y el duodeno, el primordio ventral varía progresivamente su posición hasta hacer contacto y fusionarse con el primordio dorsal (Slack, 1995), (Fig. i8).

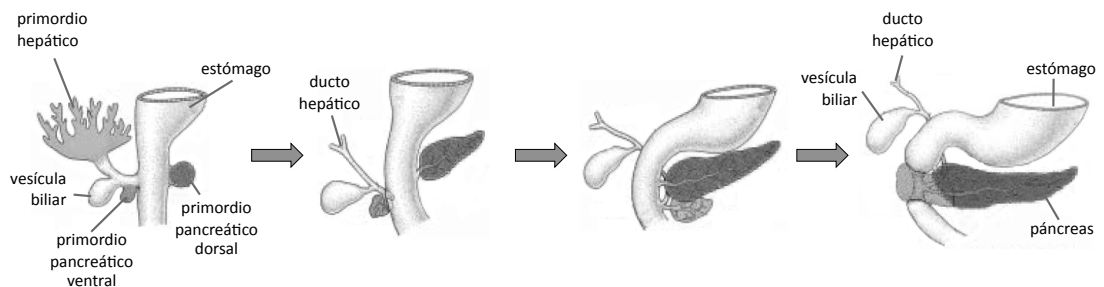


Fig. i8: Organogénesis del páncreas humano. Representación del origen de los primordios pancreáticos ventral y dorsal y de su fusión tras el proceso de torsión que sufre el tubo digestivo. Adaptado de "Medical Embryology Langman 9th edition", 2003.

A pesar de que ciertos productos pancreáticos como la amilasa no comienzan a ser generados hasta estadios avanzados del desarrollo, diversos marcadores de células diferenciadas pueden ser detectados a lo largo de todo el desarrollo del páncreas en lo que ha sido denominado el “estado protodiferenciado” (Pictet y cols., 1972; Gittes y Rutter, 1992). Las células endocrinas por ejemplo, pueden ser detectadas desde estadios tempranos de manera individual asociadas a los ductos, pudiendo encontrarse formando islotes solamente al final del desarrollo (Herrera y cols., 1991). Se ha demostrado que en ratón, la expresión de glucagón e insulina comienza en el tejido pancreático en desarrollo en estadios muy tempranos, antes del inicio de la formación de la red de ductos. Sin embargo, esta primera oleada de células endocrinas no expresan marcadores células endocrinas maduras y aunque su destino final aún no está claro, se cree que no contribuyen a la formación de los islotes pancreáticos maduros. Más adelante en el desarrollo, durante la etapa denominada “transición secundaria”, se produce una segunda oleada de diferenciación que genera un drástico incremento en el número de células endocrinas en el epitelio ductal. Hacia el final de la gestación, éstas células endocrinas se desprenden del epitelio del que se originan, migran hacia el tejido acinar circundante y se organizan formando islotes (Herrera, 2000; Herrera y cols., 1994; Lee y cols., 1999; Pang y cols., 1994; Wilson y cols., 2002).

3.2.2 Procesos de diferenciación celular en el desarrollo del páncreas.

Durante la embriogénesis, el endodermo pancreático entra en contacto con varios tejidos de origen mesodérmico que participan en la especificación, la proliferación y la morfogénesis del epitelio pancreático, por lo que todos los procesos de organogénesis y diferenciación que ocurren durante su desarrollo dependen tanto de señales intrínsecas al propio tejido pancreático como de la intervención de señales provenientes de tejidos circundantes. Se cree que las células progenitoras que dan lugar a todas las células endocrinas y exocrinas se localizan en el epitelio ductal. Sin embargo, aún no está claro si todas o alguna de estas células son realmente multipotentes con la capacidad de diferenciarse en cualquiera de los tipos celulares pancreáticos o si esos progenitores ya han sido especificados y destinados a pertenecer a un linaje pancreático en concreto.

Regionalización del endodermo y especificación de los progenitores pancreáticos.

Inicialmente, el epitelio pancreático progenitor temprano se expande y durante esta fase, la mayoría de las células de este dominio expresan los factores de transcripción *Pdx1*, *Sox9*, *Ptf1a*, *Hnf1b*, *Hes1* y *Nkx6.1* (Seymour y cols., 2007; Hald y cols., 2008; Jonsson y cols., 1994; Haumaitre y cols., 2005; Apelqvist y cols., 1999; Sander y cols., 2000). Se sabe que muchos factores involucrados en la regionalización del endodermo en etapas tempranas del desarrollo tienen a la vez importantes funciones tanto en etapas tardías de la organogénesis como en el funcionamiento del tejido adulto (Guz y cols., 1995; Offield y cols., 1996; Wu y cols., 1997). Éste es el caso del gen *Pdx1*, cuyos niveles de expresión sufren un incremento selectivo en las células β durante las fases finales del desarrollo, manteniendo niveles bajos en el tejido acinar circundante (Guz y cols., 1995; Offield y cols., 1996; Wu y cols., 1997). Durante estas fases del desarrollo pancreático, *Pdx1* está involucrado en la regulación de las proporciones entre los diferentes tipos celulares endocrinos (Gannon y cols., 2008). Además *Pdx1* es necesario para la maduración y funcionamiento de las células β (Ahlgren y cols., 1998; Dutta y cols., 1998; Stoffers y cols., 1997; Stoffers y cols., 1998). En esta misma línea apuntan resultados que demuestran que *Pdx1* regula la expresión de multitud de genes importantes para el desarrollo y el correcto funcionamiento de las células β como *insulina*, *Pax4*, *IRGP*, *Maf4*, *glucokinasa* o *glut2* (Chakrabarti y cols., 2002; Martin y cols., 2004; Ohlsson y cols., 1993; Raum y cols., 2006; Smith y cols., 2000).

Durante la regionalización del endodermo, un subconjunto de células del dominio de expresión de *Pdx1* comienzan a expresar el factor de transcripción *Ptf1a*. Estas células *Pdx1⁺/Ptf1a⁺* darán lugar a los primordios pancreáticos y a todos los tipos celulares existentes en el páncreas, mientras que las células *Pdx1⁺/Ptf1a⁻* contribuirán por el contrario a la formación del estómago y el duodeno (Burlinson y cols., 2008). A pesar de que en principio se pensó que *Ptf1a* sólo era necesario para el desarrollo de las células acinares, existen datos que revelan que es indispensable para la especificación del páncreas y para el desarrollo tanto de las células exocrinas como endocrinas (Kawaguchi y cols., 2002; Krapp y cols., 1998).

Determinación de los progenitores exocrinos y endocrinos.

La diferenciación de las células progenitoras del epitelio ductal está regulada por la vía de señalización *Notch*-Delta (Apelqvist y cols., 1999; Jensen y cols., 2000). Inicialmente, las células progenitoras expresan tanto el receptor *Notch* como su ligando Delta a bajos niveles, pero interacciones entre células adyacentes llevan a la sobreexpresión al azar de uno de los dos elementos. La vía de señalización *Notch* tiene como diana, entre otros muchos, al gen *Hes1* que es capaz de inhibir la expresión del factor de transcripción proendocrino *Ngn3* (Jensen y cols., 2000). Aquellas células en las que *Ngn3* no llega a activarse permanecen en estado indiferenciado, mientras que los progenitores en los que *Ngn3* es expresado activan el programa de diferenciación endocrino y se desprenden del epitelio ductal, de manera que todos los tipos celulares endocrinos proceden de progenitores que expresan *Ngn3*. Actualmente, *Ngn3* es considerado el marcador más temprano de células progenitoras endocrinas (Gradwohl y cols., 2000; Gu y cols., 2002).

Además del papel que juega *Ptf1a* en la adquisición de la identidad por parte del tejido endodérmico que dará lugar a los primordios pancreáticos, este gen es también de especial importancia para la diferenciación de las células pancreáticas exocrinas, ya que diversos estudios muestran que son necesarios altos niveles de *Ptf1a* para inducir la transformación de progenitores pancreáticos en células exocrinas y a la vez reprimir su especificación como tejido endocrino (Dong y cols., 2008; Fukuda y cols., 2008; Beres y cols., 2006; Masui y cols., 2007). Además también se ha demostrado que *Ptf1a* es capaz de unirse a los promotores de varios genes expresados en tejido exocrino como elastasa o tripsina (Cockell y cols., 1989; Krapp y cols., 1996) y que ratones mutantes para *Ptf1a* no llegan a desarrollar tejido acinar (Krapp y cols., 1998).

De manera opuesta a *Ptf1a*, el gen *Prox1* se expresa a altos niveles en progenitores endocrinos, presentando bajos niveles de expresión en las células exocrinas en diferenciación (Burke y Oliver, 2002). La pérdida de la expresión de *Prox1* conlleva una drástica reducción en el número de células que sufren la segunda oleada de diferenciación y un aumento asociado en el número de células acinares diferenciadas (Wang y cols., 2005).

Regulación de la diferenciación endocrina.

La diferenciación de las distintas células productoras de hormonas a partir de progenitores endocrinos parece estar temporalmente regulada ya que la aparición de cada uno de los tipos celulares se produce de manera secuencial, comenzando por las células α y seguidas por las células β , δ y PP (Johansson y cols., 2007).

Se cree que la generación de las células α y β está regulada por la acción opuesta de los factores de transcripción *Pax4* y *Arx*. *Pax4* es imprescindible para la diferenciación de las células β durante la transición secundaria (Sosa-Pineda y cols., 1997; Wang y cols., 2004), aunque varios experimentos muestran que las células *Pax*⁺ dan lugar a las células α , β y ϵ lo que sugiere que *Pax4* se expresa en progenitores endocrinos pluripotentes. A diferencia de *Pax4*, la expresión de *Arx* en los progenitores endocrinos, activada por *Ngn3*, promueve la diferenciación de células α (Wang y cols., 2008).

Pax6 es otro elemento involucrado en la diferenciación de los progenitores endocrinos. Este factor de transcripción se expresa en el epitelio pancreático temprano y más tarde en células del linaje endocrino (Jensen y cols., 2000; St-Onge y cols., 1997; Turque y cols., 1994). Aunque *Pax6* se expresa en células productoras de glucagón e insulina, parece que sólo es imprescindible para la diferenciación de las células α . Además *Pax6* parece ser importante para la expansión de la población celular endocrina en su conjunto (Heller y cols., 2005; Heller y cols., 2004) y la reducción de sus niveles de expresión parece dirigir el destino de los progenitores endocrinos a diferenciarse a células ϵ (Heller y cols., 2005).

Otra molécula que participa en la especificación de las células β es el factor de transcripción *Nkx2.2*. Éste regula la diferenciación de las células β de manera paralela a *Pax4* (Wang y cols., 2004) y aunque su presencia puede ser detectada en todas las células productoras de hormonas excepto en las células δ , sólo es esencial para la diferenciación de las células productoras de insulina. También ha podido demostrarse que *Nkx2.2* regula la expresión de otro miembro de la misma familia de proteínas, el factor de transcripción *Nkx6.1*, que controla a su vez la expresión de *Ngn3* y que promueve la especificación de las células β a partir de progenitores *Pdx1*⁺ (Henseleit y cols., 2005).

Factores procedentes del mesodermo implicados en el desarrollo pancreático.

La supresión de la actividad de la vía de señalización *Wnt* en el endodermo anterior es necesaria para el desarrollo tanto del hígado como del páncreas (McLin y cols., 2007). Durante la fase de regionalización del endodermo, los tejidos mesodérmicos que rodean el tubo digestivo en formación secretan moléculas señalizadoras que promueven la organogénesis del páncreas y el hígado a partir de una región común del endodermo. Por ejemplo, en la parte ventral del tubo digestivo anterior en desarrollo, proteínas de la familia de las BMP (BMP4 en ratón y BMP2 en pez cebra y pollo), secretadas por el mesénquima del septo transversal, y *Fgf1/2*, producidos por el mesodermo cardíaco, inducen el desarrollo del hígado mientras que inhiben la activación del programa de desarrollo pancreático (Chung y cols., 2008; Deutsch y cols., 2001; Rossi y cols., 2001; Shin y cols., 2007; Zhang y cols., 2004). Además trabajos realizados en *Xenopus* han identificado a la proteína correpresora TGIF2 como factor que actúa limitando la señalización de las proteínas BMP en el endodermo y promoviendo la activación de genes pro-pancreáticos (Spagnoli y Brivanlou, 2008).

Varios estudios han mostrado también cómo señales procedentes de la notocorda inducen la formación del páncreas. Desde su formación, la notocorda está en contacto con el endodermo prepancreático hasta la fase en la que las dos aortas dorsales se fusionan colocándose entre la notocorda y el endodermo. La notocorda participa en la inducción de la formación del páncreas inhibiendo la expresión del morfógeno *sonic hedgehog (Shh)* por parte del endodermo subyacente (Hebrok y cols., 1998). La retirada de *Shh* del endodermo pancreático es necesaria para evitar la adquisición de identidad intestinal por parte del endodermo prepancreático (Apelqvist y cols., 1997). Tras la fusión de las dos aortas dorsales, la notocorda deja de estar en contacto con el endodermo prepancreático. En esta fase, señales producidas por las células endoteliales aórticas son necesarias para el mantenimiento de la expresión de *Pdx1*, la generación del primordio pancreático dorsal y el comienzo de la expresión de *Ptf1a* e insulina (Lammert y cols., 2001; Yoshitomi y Zaret, 2004). Las señales producidas por la aorta regulan las interacciones entre el endodermo y el mesénquima que lo rodea, ya que el endotelio induce la expresión del factor *Fgf10* por

parte del mesodermo, que resulta necesario para la proliferación de los progenitores pancreáticos y el crecimiento y la ramificación del epitelio (Jacquemin y cols., 2006).

La vía de señalización del ácido retinoico tiene también importantes papeles en diferentes fases del desarrollo pancreático. El AR producido por el mesodermo que rodea al tubo digestivo en formación está relacionado con la regionalización de esa parte del endodermo, ya que se ha visto que el tratamiento de embriones de *Xenopus* o *D. rerio* con RA produce la expansión del dominio endodérmico prepancrático hacia la región anterior (Stafford y cols., 2004). También se ha demostrado que al interferir con la vía de señalización del AR, se produce una pérdida de la expresión de *Pdx1*, el marcador endocrino temprano *Isl1* e *insulina* (Stafford y Prince, 2002; Stafford y cols., 2006). Además de las funciones tempranas que tiene durante la regionalización del endodermo y la especificación pancreática, el AR es importante para regular el establecimiento de las proporciones correctas de células endocrinas y exocrinas (Chen y cols., 2004; Kadison y cols., 2001; Kobayashi y cols., 2002; Tulachan y cols., 2003; Ostrom y cols., 2008).

3.2.3 Desarrollo del páncreas en pez cebra.

En los últimos tiempos, el pez cebra se ha convertido en una especie modelo muy popular para estudiar el desarrollo embrionario de vertebrados. Las larvas de *D. rerio* son transparentes y se desarrollan fuera de la madre, por lo que el análisis de las estructuras embrionarias en desarrollo *in vivo* resulta de gran facilidad. Además, en los últimos años de han desarrollado herramientas potentes y de sencilla utilización para el estudio del desarrollo embrionario del pez cebra como la generación de animales transgénicos o el bloqueo selectivo de la expresión génica. Estas características hacen de este organismo una especie modelo ideal para el estudio del desarrollo pancreático.

Morfogénesis del páncreas en pez cebra.

El páncreas del pez cebra presenta una estructura clásica con un componente exocrino, integrado por células acinares y una red de ductos, y un componente endocrino, con células α , δ , ϵ y PP, que expresan y segregan glucagón, insulina, somatostatina, ghrelina y

polipéptido pancreático respectivamente (Biemar y cols., 2001; Argenton y cols., 1999; Pauls y cols., 2007; Devos y cols., 2002).

Los tejidos endocrino y exocrino del páncreas del pez cebra se originan a partir de dos primordios que, al igual que en mamíferos, emergen secuencialmente de áreas contiguas del tubo digestivo en formación en dos momentos diferentes del desarrollo. El primordio posterodorsal es el primero en aparecer (Fig. i9) y se forma a partir de dos grupos de células que emergen de los laterales de la gástrula y que terminan convergiendo en la línea media del embrión mientras expresan *pdx1* (Biemar y cols., 2001). Esta fusión de los dos grupos de células ocurre en el estadio de 16 somitos. Más tarde, en el estadio de 24 somitos estas células conforman el primordio que emerge en posición dorsal al tubo digestivo. Éste primordio da lugar a tejido endocrino que sintetiza las hormonas pancreáticas principales. Posteriormente, entre las 24 y las 48 hpf (horas postfertilización) el primordio dorsal queda

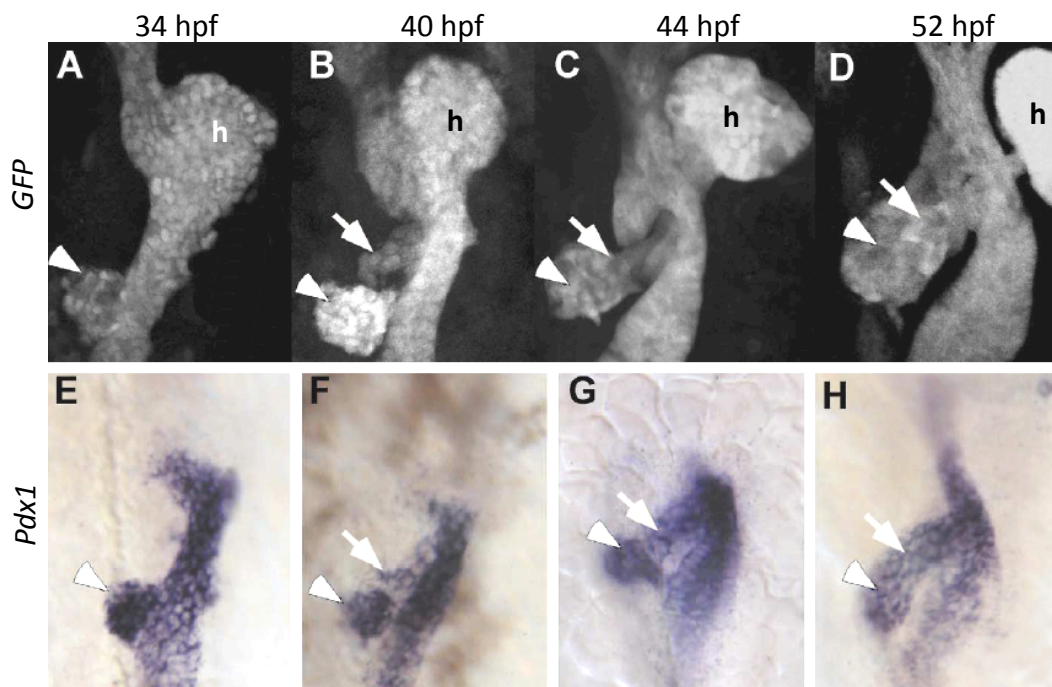


Fig. i9: Organogénesis del páncreas en pez cebra. Vistas ventrales de la zona hepato-pancreática de embriones de pez cebra orientados con la región anterior hacia arriba, en diferentes momentos del desarrollo. A-D: imágenes de microscopía confocal de embriones transgénicos que expresan GFP en el tubo digestivo. E-H: hibridaciones *in situ* utilizando una sonda anti-*pdx1*. El primordio posterodorsal (punta de flecha) es claramente visible a las 34 horas post-fertilización (hpf) (A) y a las 40 hpf (B), pero queda oculto por el primordio anteroventral (flecha) a las 44 hpf. *Pdx1* se expresa en ambas estructuras tanto antes (E y F), como después (G y H) de entrar en contacto. A las 52 hpf, (D y H) el páncreas aparece ya como una única estructura. (h: hígado). Modificado de Field y cols., 2003.

desplazado al lado derecho del tubo digestivo. A las 48 hpf, el primer islote pancreático ya está organizado presentando la misma estructura que un islote de mamífero, con células β y δ rodeando a un conjunto central de células α .

El segundo primordio emerge a las 40 hpf a partir de la región ventral del área del tubo digestivo inmediatamente anterior al primer islote pancreático en formación. Este primordio antero-ventral da lugar al tejido exocrino y los ductos pancreáticos y, más tarde, a un pequeño conjunto de células endocrinas en estrecha relación con los ductos (Field y cols., 2003). Tras su aparición, el segundo primordio crece en dirección posterior hasta hacer contacto con el primordio postero-dorsal y envolverlo progresivamente (Field y cols., 2003; Wendik y cols., 2004; Zecchin y cols., 2004), (Fig. i9).

A diferencia del modelo de crecimiento ramificado propuesto para mamíferos, el sistema de ductos intrapancreáticos del pez cebra se desarrolla a partir de un grupo de progenitores que se unen, generando de la red de ductos pancreáticos mediante la morfogénesis no polarizada del epitelio (Yee y cols., 2005; Pauls y cols., 2007).

Durante la etapa adulta de *D. rerio*, las células β se encuentran organizadas en un gran islote pancreático y un grupo de pequeños islotes secundarios dispersos a lo largo del tubo digestivo o rodeados de tejido exocrino (Pauls y cols., 2007).

Regionalización del endodermo e inducción pancreática.

Al igual que ocurre en mamíferos, el primer paso en el desarrollo del páncreas consiste en la regionalización antero-posterior del tubo digestivo en formación, un proceso dirigido por la actividad simultánea de múltiples vías de señalización entre las que se incluyen la vía *Wnt*, del ácido retinoico, *Bmp*, *Fgf* y *Shh*.

La vía *Wnt*/ β -catenina está implicada en numerosos procesos de desarrollo con importantes funciones en el control de la organogénesis, la proliferación celular y la diferenciación. Durante los estadios tempranos de la somitogénesis, la supresión de la vía *Wnt* es necesaria para la correcta regionalización del endodermo. Más tarde, un incremento de la actividad de esta vía influye en la toma de decisiones del destino celular

promoviendo el desarrollo del hígado en detrimento de la formación del páncreas (Goessling y cols. 2008).

El ácido retinoico muestra la capacidad de dotar al endodermo anterior de identidad pancreática (Stafford y Prince, 2002). Así, se ha podido demostrar que el AR producido en el mesodermo actúa de manera directa sobre el endodermo induciendo la generación de precursores pancreáticos endocrinos (Stafford y cols. 2006). De igual manera, se ha comprobado que *BMP2b* también contribuye a la regionalización del endodermo anterior durante la gastrulación de los embriones de pez cebra, actuando mediante gradientes de concentración (Tiso y cols., 2002).

Experimentos realizados en los últimos años han arrojado resultados que muestran que la vía de señalización *Fgf* también es esencial para la regionalización del endodermo y la organogénesis del páncreas. Se ha podido detectar comunicación recíproca entre el endodermo y mesodermo mediada por miembros de la familia *Fgf* que resulta fundamental para la especificación del primordio pancreático ventral (Manfroid y cols., 2007).

A pesar de que hasta el momento existen pocos datos acerca de la interconexión entre las vías de señalización *Fgf*, *Bmp* y RA durante la regionalización del endodermo y la organogénesis del páncreas en pez cebra, existen trabajos que describen la actuación de *Fgf* y *Bmp* aguas arriba de factores de la vía del AR, para regular la formación del páncreas a través de la actividad integradora del factor de transcripción *Hnf1b*, relacionado con el desarrollo del páncreas, el hígado y el riñón en vertebrados (Lokmane y cols., 2008).

Diversos trabajos realizados hasta el momento revelan también importantes funciones de Shh en la regionalización del endodermo (Chung y Stainier, 2008; Dilorio y cols., 2007; Kinkel y cols., 2008), en la especificación y la diferenciación de los progenitores endocrinos y en la morfogénesis del islote pancreático en pez cebra (Noel y cols., 2008), aunque el papel de esta proteína señalizadora no ha aún sido claramente definido.

Diferenciación de los progenitores pancreáticos en pez cebra.

Numerosos factores de transcripción como *Pdx1*, *Ptf1a* o *Ngn3* que actúan en el desarrollo pancreático de ratón y humanos, son también expresados en *D. rerio* (Biemar y cols., 2001).

Las vías de señalización clásicamente relacionadas más directamente con la diferenciación a partir de precursores y con la adquisición de un destino celular son las vías *Fgf* y *Notch*. Mutantes de pez cebra para el gen *fgf10* presentan un exceso de diferenciación de células del linaje endocrino a costa de una reducción del número de células ductales, lo que muestra la importante implicación de la vía *Fgf* en el desarrollo del sistema de ductos hepatopancreáticos.

Los genes señalizadores de la vía *Notch* inhiben activamente la diferenciación de las células acinares tanto en ratón como en pez cebra (Esni y cols., 2004). A lo largo del compartimento endocrino, diferentes ligandos de *Notch* se expresan durante el desarrollo pancreático temprano en ratón, pollo, *Xenopus* y *D. rerio*. Además se ha visto que diferentes ligandos de *Notch* de las familias Delta y Jagged controlan la especificación celular tanto endocrina como exocrina (Zecchin y cols., 2007).

Ngn3 también ha sido analizado, obteniéndose resultados que sugieren que este gen está involucrado en la diferenciación de las células enteroendocrinas del tubo digestivo y que podría estar también relacionado en la diferenciación pancreática del pez cebra (Zecchin y cols., 2007). *Ptf1a*, que también ha sido estudiado, parece por su parte inducir la adquisición de la identidad endocrina o exocrina al expresarse a bajos o altos niveles respectivamente (Dong y cols., 2008).

4. Los protooncogenes *Myc*, *Yap* y *TEAD* en el desarrollo embrionario.

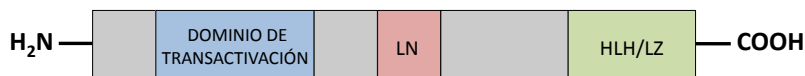
Para la realización de esta tesis doctoral, se ha centrado la atención en el análisis de los protooncogenes *Myc*, *YAP* y *TEAD* con el objeto de profundizar en el conocimiento de sus funciones durante el desarrollo embrionario de vertebrados.

4.1 Los genes *Myc*

Inicialmente, el gen *C-myc* fue descrito como el homólogo del oncogen retroviral *v-myc* (Bishop, 1982; Bister y Jansen, 1986; Sheiness y cols., 1978). Más tarde, se pudo demostrar que éste se encuentra sobreactivado en multitud de tumores (Cole, 1986; Dalla-Favera y cols., 1982). *C-myc* es el miembro más estudiado de la familia de genes *Myc* a la que también pertenecen *B-Myc*, *L-Myc*, *N-Myc* y *s-Myc*, aunque sólo *c-Myc*, *L-Myc* y *N-Myc* están relacionados con la inducción de neoplasias (Facchini y Penn, 1998; Henriksson y Luscher,

1996; Marcu y cols., 1992; Spencer y Groudine, 1991). El análisis de la secuencia de la proteína c-MYC revela que ésta posee un dominio de transactivación cerca del extremo N-terminal, necesario para la activación de la expresión génica mediante la interacción directa con el ADN, y un dominio HLH/LZ (helix-loop-helix/leucine zipper) involucrado en la interacción proteína-proteína en el extremo C-terminal (Dang y cols., 1992; Dong y cols., 1994; Ferre-D'Amare y cols., 1994), (Fig. i10a). Este dominio HLH/LZ permite a c-MYC formar heterodímeros con la proteína MAX para formar complejos c-MYC-MAX. La formación de estos complejos permite a c-MYC ejercer funciones de activador o represor transcripcional mediante la unión a secuencias específicas de ADN denominadas cajas E (Solomon y cols., 1993), (Fig. i10b) y el reclutamiento de otros factores de transcripción. Sin embargo, también existen datos que sugieren que c-MYC es capaz de actuar como represor transcripcional mediante la unión a otros elementos reguladores denominados Inr presentes en los promotores de ciertos genes (Smale y Baltimore, 1989).

A



B

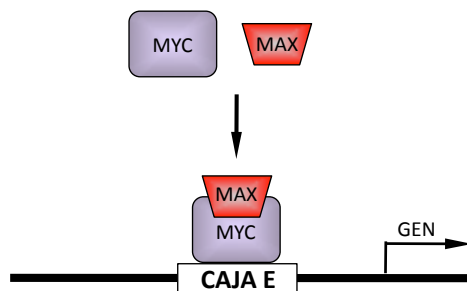


Fig. i10: La proteína MYC. La secuencia peptídica de MYC presenta varios dominios funcionales (A). El dominio de localización nuclear (LN) le permite ser transportada al núcleo, mientras que gracias al dominio HLH/LZ es capaz de unirse a MAX. Mediante el dominio de transactivación, el dímero MYC/MAX se une a sus elementos reguladores diana o cajas E para regular la expresión génica (B).

Funciones de los genes Myc.

La regulación del ciclo celular es la función más importante y estudiada de los genes *Myc*. Se ha demostrado que *c-Myc* promueve el paso de las células de la fase G0 a G1 del ciclo celular y que regula la transcripción de genes que intervienen tanto en el crecimiento y la proliferación como en la apoptosis durante toda la fase G1. (Morrish y cols., 2009). Numerosos trabajos realizados hasta el momento sugieren que *c-Myc* es capaz de activar la maquinaria del ciclo celular, por lo que este protooncogén es considerado un gen maestro capaz de activar gran cantidad de genes (Dang y cols., 2006; Zeller y cols., 2006).

También se ha podido demostrar el importante papel de *c-Myc* en la regulación del metabolismo celular al ser capaz de controlar la expresión de numerosos genes que codifican para proteínas pertenecientes a diferentes rutas metabólicas. Por ejemplo, se ha visto como animales transgénicos que presentan una sobreexpresión de *c-Myc* en el hígado, muestran como consecuencia un incremento en los niveles de diferentes enzimas hepáticas relacionadas con la glucólisis (Valera y cols., 1995). Así mismo, muchos tumores presentan sobreexpresión del gen *Ldha*, que participa en el metabolismo anaeróbico de la glucosa y que está entre los genes regulados por *c-Myc* (Shim y cols., 1997).

También son múltiples las evidencias que relacionan al gen *c-Myc* con la muerte celular programada. Por ejemplo, se ha demostrado que los dominios de *c-MYC* implicados en la regulación transcripcional son los mismos necesarios para la inducción de la apoptosis en fibroblastos en determinadas condiciones de cultivo (Evan y cols., 1992). Además otros estudios demuestran que *c-Myc* afecta a la transcripción de diferentes genes que intervienen en la apoptosis, como es el caso de *Ocd* (Packham y Cleveland, 1994) o *Tp53* (Liu y cols., 2008).

Estas evidencias forman parte de las observaciones que otorgan a *c-Myc* el papel de gen maestro y dan una idea de su importante implicación en multitud de procesos celulares, lo que unido al hecho de que una delección homocigótica del gen *c-Myc* es letal en embriones murinos (Dang, 1999), sugiere que la correcta expresión de este gen es esencial para el desarrollo embrionario.

Regulación de los niveles de c-Myc.

Los niveles de expresión de *c-Myc* son regulados por complejos mecanismos a nivel transcripcional y postranscripcional. En células normales, el gen *c-Myc* se transcribe de manera controlada en diferentes tejidos, mientras que en células neoplásicas la transcripción se lleva a cabo de forma anormal (Dalla-Favera y cols., 1982). La regulación defectuosa de la expresión del gen *c-Myc* puede tener entre sus causas eventos tales como mutaciones puntuales, amplificaciones, alteraciones numéricas y estructurales de los cromosomas o inserciones virales y estas alteraciones se relacionan con la transformación e inmortalización de las células neoplásicas (Eilers y Eisenman, 2008; Yakut y cols., 2003). Hasta el momento han sido identificadas multitud de secuencias no codificantes que intervienen en el control transcripcional de *c-Myc*. Así por ejemplo, se conocen cuatro promotores capaces de reclutar los factores necesarios para iniciar la transcripción. Sin embargo, en células normales, el ARNm sintetizado a partir del promotor P2 constituye del 80% al 90% del total (Liu y cols., 2008; Schmidt, 2004). Además de los distintos promotores alternativos, también han sido identificadas multitud de elementos no codificantes capaces de interactuar con *c-Myc* y controlar sus niveles de expresión. Estudios de asociación realizados en los últimos años han encontrado numerosos polimorfismos en la región 8q24, donde se localiza *c-Myc* y que están asociados con un incremento en la susceptibilidad de desarrollar cáncer de mama, próstata o colorrectal. Estos loci de riesgo se sitúan en el desierto génico existente en las cercanías de *c-Myc* y aunque los mecanismos biológicos que subyacen bajo estas asociaciones aún no se conocen con exactitud, se ha podido demostrar que en dicha región existen algunas secuencias con actividad enhancer y con capacidad de contactar físicamente con el promotor de *c-Myc* para regular su transcripción (Sotelo y cols., 2010).

Los genes Myc en pez cebra.

Hasta el momento han sido anotados 6 genes de la familia *Myc* en el genoma del pez cebra. A partir de análisis filogenéticos y de sintenia se ha podido determinar que *D. rerio* posee una única copia de los genes *mych* y *mycn* (homólogo de *N-Myc* de humanos). Además posee dos genes homólogos de *c-Myc*, generados por la duplicación genómica ocurrida en

la base de los telósteos, denominados *myca* y *mycb* y otros dos homólogos de *L-Myc* anotados como *mycl1a* y *mycl1b* y cuya duplicación tiene el mismo origen.

A pesar de que no existe gran cantidad de datos acerca de esta familia de genes en pez cebra, se sabe que todos los genes *myc* se expresan en la retina, el sistema nervioso central, los arcos branquiales y los primordios de las aletas pectorales. Sin embargo, *myca*, *mycn* y *mych* presentan un patrón de expresión más restringido al cerebro que *mycb*, *mycl1a* y *mycl1b* cuyos transcritos han podido ser también detectados, aunque de manera débil, en el primordio de la línea lateral y los neuromastos derivados donde también se expresa *mych* en niveles elevados (Fig. i11). Además de ha podido detectar la expresión de *myca*, *mycn* y *mycl1a* en el ducto del pronefros (Meijer y cols., 2008).

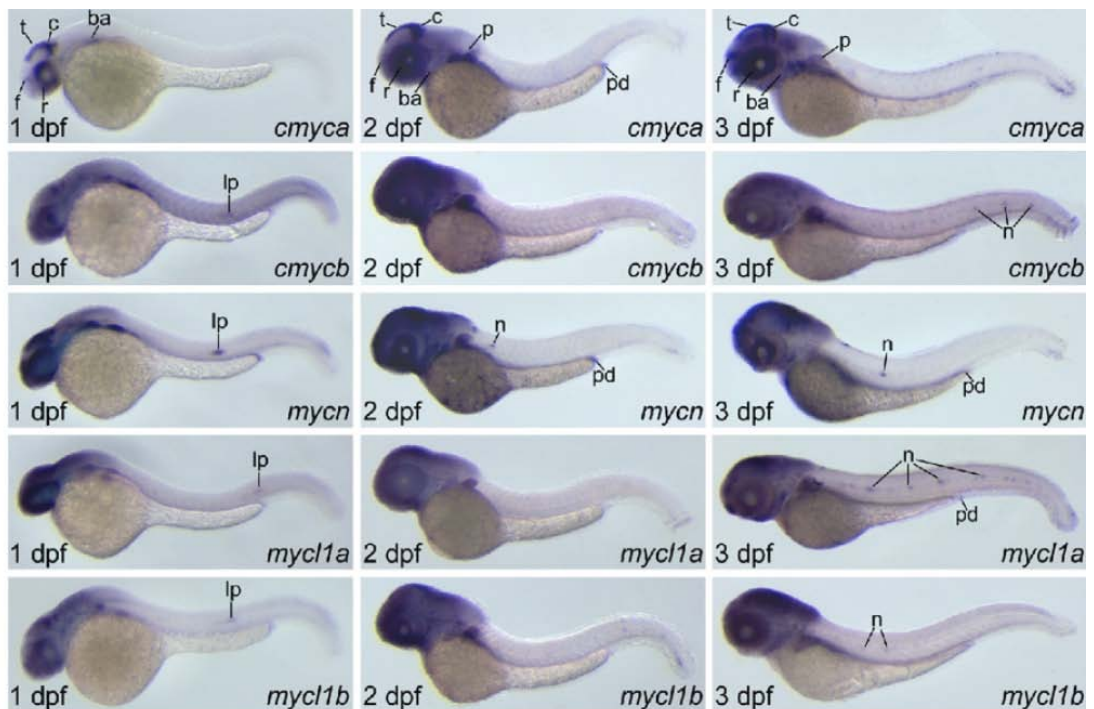


Fig. i11: Patrones de expresión de los genes *myc* en pez cebra. Vista lateral de los patrones de expresión de los genes *myc* a 1, 2 y 3 días post-fertilización (dpf) puestos de manifiesto mediante hibridación *in situ*. (ba: arcos branquiales; c: cerebelo; f: cerebro anterior; lp: primordio de la línea lateral; n: neuromastos; p: primordio de la aleta pectoral; pd: ducto pronefrico; r: reina; t: tectum; v: plexo venoso). Adaptado de Meijera y cols., 2008.

4.2 Los genes Yap y TEAD en la ruta de señalización Hippo.

La ruta Hippo es una vía de señalización que tiene como principal función el control de la proliferación celular y la apoptosis mediante la regulación transcripcional de multitud de genes diana. Fue descrita originalmente en *Drosophila melanogaster* como un mecanismo celular para determinar el tamaño de los órganos y cuyas mutaciones pueden ser causa de generación de neoplasias (Fig. i12). La vía Hippo está altamente conservada entre especies y en mamíferos también controla el crecimiento de los órganos (Fig. i12; Tabla i2) y tiene características de supresor tumoral.

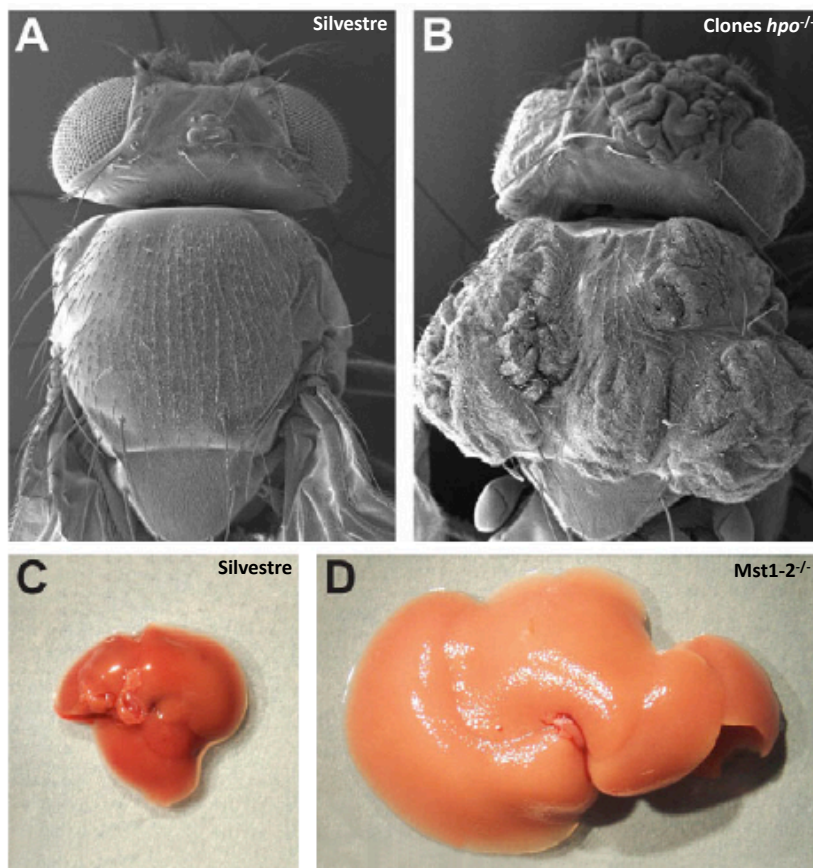


Fig. i12: Mutantes de la vía Hippo en *Drosophila* y ratón. A-B: Imágenes de microscopía electrónica de barrido de una mosca silvestre (A) y una mosca mosaico con clones de células mutantes para *hippo* mostrando un crecimiento hiperplásico de las células de la cutícula (Udany cols., 2003). En ratones, el tamaño del hígado a la edad de dos meses, es mucho mayor en animales mutantes para los genes *Mst 1/2* (D) que en animales silvestres (A), (Lee y cols., 2010; Lu y cols., 2010; Song y cols., 2010; Zhou y cols., 2009).

<i>Drosophila</i>	Humanos
Hippo	Mst1-2
Salvador	Sav1/WW45
Warts	Lats1-2
Mats	MOBKL1A-B
Yorkie	YAP, TAZ
Scalloped	TEAD1-4
Kibra	KIBRA/WWC1-2
Expanded	FRMD6/Ex1, FRMD1/Ex2
Merlin	NF2/Merlin
Fat	Fat4/Fat-j
Dachsous	Dchs1-2
Crumbs	Crb1-3
Lgl	Lgl1-2
RASSF	RASSF1-6

Tabla i2: Principales componentes de la vía Hippo en *Drosophila* y sus homólogos en humanos.

Básicamente, la vía Hippo (Fig. i13) puede ser dividida en tres partes interrelacionadas: los elementos reguladores primarios, el cuerpo principal integrado por kinasas y la maquinaria reguladora transcripcional.

En *Drosophila*, el grupo de elementos reguladores primarios está compuesto por merlín, kibra y expanded (Hamaratoglu y cols., 2006; Yu y cols., 2010) que son capaces, mediante su acción conjunta, de activar la cascada de fosforilación que compone el cuerpo principal de la vía Hippo. En mamíferos, también ha podido demostrarse la existencia de un homólogo de merlín que, al igual que en *Drosophila* es capaz de activar la ruta de señalización (Yokoyama y cols., 2008).

El núcleo central de la ruta Hippo está compuesto por cuatro proteínas, dos de las cuales, Hippo y Warts en *Drosophila* y Mst1/2 y Lats1/2 en mamíferos, son kinasas. Las otras dos proteínas, Salvador y Mats en moscas y WW45 y Mob en mamíferos, cumplen funciones de adaptadores y coactivadores.

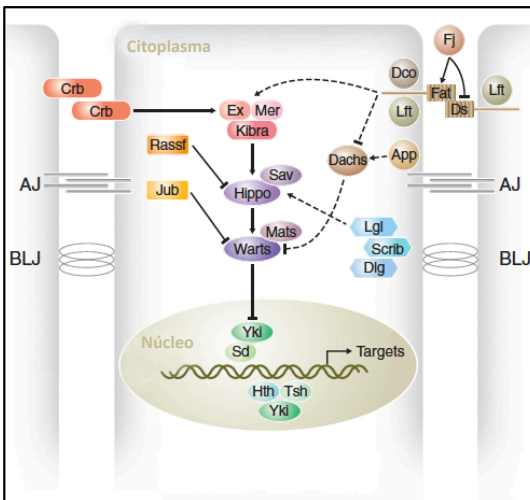
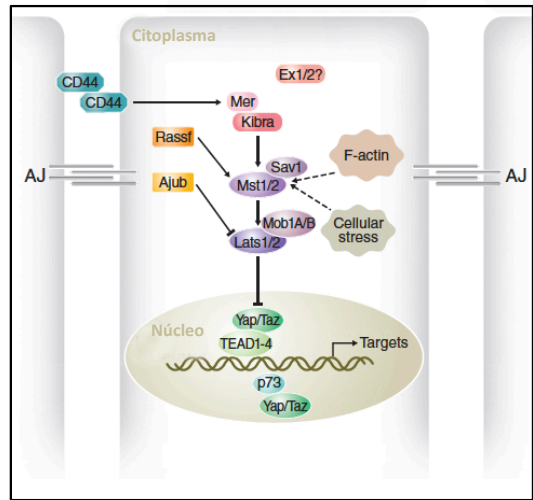
A *Drosophila***B** *Vertebrados*

Fig. i13: Vía de señalización Hippo. Representación esquemática de la vía Hippo en *Drosophila* (A) y vertebrados (B). Las interacciones directas e indirectas entre los diferentes elementos, están representadas por líneas continuas y discontinuas respectivamente. Las relaciones de activación son representadas mediante flechas y las de inhibición mediante líneas con final truncado. Modificado de Halder y Johnson, 2011.

Finalmente, la principal diana de la cascada de fosforilación es el coactivador transcripcional Yorkie (Yki) en *Drosophila* (Huang y cols., 2005) y sus homólogos de mamífero Yap y Taz. Yorkie y sus homólogos Yap y Taz regulan un programa transcripcional mediante la interacción con el factor de transcripción Scalloped en *Drosophila* o su homólogo en mamíferos TEAD (Goulev y cols., 2008; Wu y cols., 2008; Zhang y cols., 2008; Zhao y cols., 2008). La fosforilación de Yap y Taz por la vía Hippo conlleva su secuestro en el citoplasma y su posterior degradación. Por tanto, esta ruta de señalización actúa regulando la actividad de Yap y Taz en el núcleo celular mediante el control tanto de sus niveles como de su distribución.

A pesar de que los mecanismos de transducción de la señal por parte del núcleo central de las quinasas Hippo/Mst y Warts/Lats son relativamente bien conocidos, se sabe menos acerca de los elementos capaces de activar la vía de señalización. En el caso de mamíferos, parece que existen receptores de membrana como CD44, capaces de activar la cascada de quinasas (Xu y cols., 2010).

Los genes Yap y TEAD.

Del mismo modo que muchos de los integrantes de la ruta Hippo son genes supresores de tumores, *Yorkie*, *Yap* y *Taz* han sido descritos como protooncogenes. Así, se han podido encontrar niveles elevados de expresión de *Yap* en algunos cánceres humanos incluyendo cáncer de mama, colorrectal o hepático (Kango-Singh y Singh, 2009; Zender y cols., 2006; Steinhardt y cols., 2008).

La proteína YAP de mamíferos, homóloga de YKI en *Drosophila*, funciona como factor de transcripción. La secuencia de YAP tiene un alto grado de homología con TAZ, con la que comparte el 46% de su secuencia, presentando ambas varios dominios comunes (Kanai y cols., 2000). YAP lleva a cabo su actividad transcripcional junto con otros coactivadores como las proteínas TEAD, de las que han sido identificadas cuatro miembros (TEAD1-4), PPAR γ , TTF-1, Runx2 y algunas proteínas SMAD (Hong y cols., 2005). La actividad conjunta con TEAD parece ser especialmente importante. Los complejos transcripcionales que las proteínas TEAD forman junto con YAP o TAZ activan numerosos genes diana entre los que se encuentra *BIRC5*, también denominado *survivina*, que funciona como inhibidor de la apoptosis (Dong y cols., 2007).

Objetivos

Objetivos

1. Ampliación de la colección de líneas transgénicas ED de pez cebra existente en nuestro laboratorio, localización del punto de inserción del vector en el genoma de cada una de ellas y utilización de las mismas para la búsqueda de nuevos genes regulados por la vía de señalización del ácido retinoico.
2. Descripción de las consecuencias biológicas de la manipulación de la actividad de la vía de señalización del ácido retinoico, sobre los niveles de expresión de mycb en los arcos branquiales y la organización de su entorno genómico.
3. Análisis del papel de la vía de señalización Hippo sobre el desarrollo del páncreas.

Materialles y métodos

1. Generación de la colección de líneas ED..

Para generar la colección de líneas transgénicas de pez cebra (*Danio rerio*) usadas en este trabajo, se utilizó el método de transgénesis basado en el transposón *Tol2*, procedente de medaka (Kawakami y cols., 2000), mediante el cual es posible insertar un fragmento de ADN exógeno, el vector ED (Expression Disruption) en nuestro caso, en el genoma del pez. Para ello, el fragmento de ADN debe ir flanqueado por secuencias específicas que son reconocidas por la transposasa, la enzima responsable de la inserción, cuyo ARNm es inyectado conjuntamente con el fragmento de ADN a insertar en embriones en estadio de una célula.

El vector ED (Fig. m1) consta de dos detectores de elementos reguladores o “enhancer traps” separadas por una secuencia aisladora compuesta por el aislador GAB procedente del entorno genómico del gen de la *Tirorinasa* de ratón (Giraldo y cols., 2003) y por el aislador 5’HS4 de la *Beta-globina* de pollo (Chung y cols., 1993; Recillas-Targa y cols., 2002). Uno de los dos “enhancer traps” contiene el gen de la proteína fluorescente verde (Green Fluorescent Protein, GFP) como gen reportero bajo el control del promotor mínimo del gen *gata2a*, mientras que el otro está compuesto

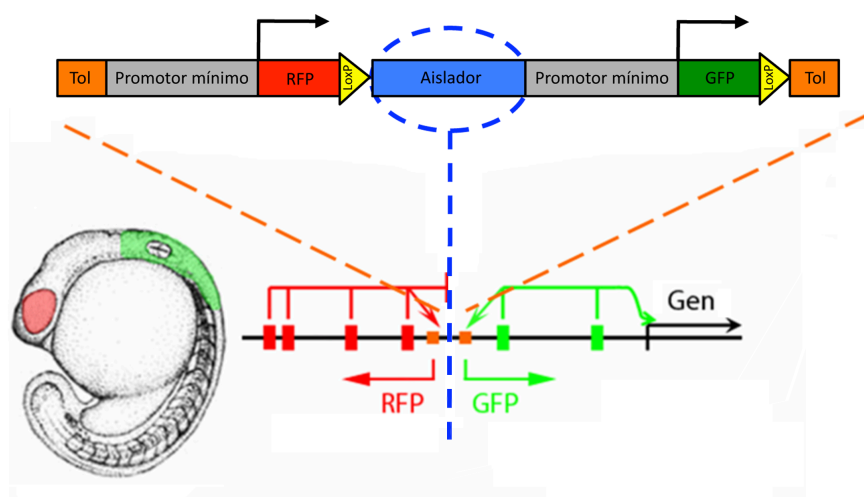


Fig. m1: Vector ED. Representación esquemática del punto de inserción del vector ED en un entorno genómico hipotético. El vector está compuesto por dos “enhancer traps”, uno con GFP como gen reportero (caja verde) y otro con RFP (caja roja) y por un aislador separándolos (caja azul). El aislador y el “enhancer trap” RFP se encuentran flanqueados por secuencias loxP (triángulos amarillos). El entorno genómico queda, en este caso, dividido por el aislador, lo que nos permite detectar diferencialmente la información regulatoria aguas arriba (elementos reguladores de color rojo que dirigen expresión de GFP en el ojo) y aguas abajo (elementos reguladores de color verde que dirigen expresión de GFP en el cerebro posterior) del punto de inserción. El bloqueo de los elementos reguladores aguas arriba por el aislador tiene como resultado una mutación regulatoria. Adaptado de Bessa y cols., 2013.

por la proteína fluorescente roja (red fluorescent protein, RFP) mCherry como gen reportero bajo el control del promotor mínimo del gen *irx3a* (Bessa y cols., 2009).

1.1 Metodología de transgénesis en pez cebra.

El día anterior a la inyección, los peces fueron separados por sexos y se mantuvieron en tanques independientes durante la noche. A la mañana siguiente, fueron cruzados en un tanque común a la hora del encendido automático de la iluminación del animalario, aprovechando este estímulo para la puesta de huevos. Los embriones producidos, que quedaron depositados en el fondo del tanque y separados de los peces adultos mediante una malla, fueron recogidos inmediatamente tras la fecundación e inyectados dentro de los 20 minutos siguientes mientras los embriones se encontraban aún en estado de una célula.

La mezcla de inyección estuvo compuesta por 20 ng/μl de ADN del vector ED y 25 ng/μl de ARNm de la transposasa. Las concentraciones de ambos componentes fueron cuantificadas mediante el uso de un espectrofotómetro (Nanodrop Thermo Fisher Scientific). Además la mezcla de inyección contenía 0,05% de rojo fenol para visualizar la microgota inyectada, de aproximadamente 5 nl, en el citoplasma de la célula del embrión o en la zona del vitelo más próxima a ésta.

La inyección fue realizada usando capilares de vidrio de 1 mm de diámetro externo y 0,58 mm de diámetro interno (nºcat. G100F6, Warner Instruments) estirados en un estirador horizontal automático (P-97 Flaming/Brown Micropipette Puller, Sutter Instrument) y acoplados a un microinyector programable (IM-300, Narishige) mediante un micromanipulador.

Los embriones inyectados fueron analizados mediante su visualización bajo una lupa de fluorescencia (SZX16, Olympus) y los embriones que mostraron expresión de GFP o RFP entre las 24 y las 48 horas post-fertilización (hpf) fueron seleccionados para ser crecidos hasta la edad adulta. Estos, fueron mantenidos a 28°C en medio E3 (5 mM NaCl, 0,17 mM KCl, 0,4 mM CaCl₂, 0,16 mM MgSO₄, 0,00003% azul de metileno) hasta el cuarto día de vida, en el que fueron trasladados al animalario para su crecimiento. Posteriormente, estos peces fueron cruzados individualmente con animales silvestres para generar las líneas transgénicas estables. Los embriones resultantes de estos cruces fueron anestesiados con tricáina (etil 3-aminobenzoato, Sigma) y analizados bajo la lupa de fluorescencia. Además, se documentaron sus patrones de expresión de GFP y RFP a las 24 y 48hpf. Para ello, fueron mantenidos hasta ese momento en medio E3 conteniendo 0,003% de 1-fenil-tiourea (PTU, Sigma) para evitar la pigmentación y que los patrones de expresión de los reporteros fuera

claramente visible. Los embriones seleccionados, que representan la generación F1 de cada línea ED, fueron igualmente trasladados al animalario para su crecimiento hasta la edad adulta. Las líneas ED estables fueron mantenidas mediante cruces con animales silvestres.

1.2 Identificación de los lugares de inserción del vector ED.

Los sitios de integración del vector ED fueron identificados mediante la técnica de la PCR inversa. Para cada línea ED, se extrajo ADN genómico de 5 embriones por separado, que fue digerido con la enzima de restricción *Sau3AI* (Roche) y posteriormente ligado usando la ligasa T4 (Promega). El ADN ligado fue usado como molde para la PCR inversa. Se realizaron dos rondas de PCR anidada para cada uno de los dos extremos del transposón. Para el extremo correspondiente al reportero GFP, se usaron los cebadores 5ToIF1 y 5ToIR1 para la primera ronda de PCR y 5ToIF2 y 5ToIR2 para la segunda (Tabla supl. 2). Así mismo, para el extremo correspondiente al RFP se usaron los cebadores 3ToIF1 y 3ToIR1 para la primera ronda de PCR, mientras que para la segunda ronda se utilizaron los cebadores 3ToIF2 y 3ToIR2 ó 3ToIF2 y 3ToITest (Tabla supl. 2). Los productos de PCR resultantes fueron visualizados en un gel de agarosa al 2% y, para cada punta del transposón, la banda común para los cinco embriones fue aislada, y purificada usando el kit de purificación de ácidos nucleicos GENECLAN (MP Biomedicals) y posteriormente clonada en el vector TOPO (Invitrogen, pCR®8/GW/TOPO® TA cloning KIT). Los clones de TOPO resultantes fueron posteriormente enviados a secuenciar utilizando el cebador GW1 (Tabla supl. 2).

Tras el proceso de secuenciación, las secuencias obtenidas fueron analizadas para identificar fragmentos adyacentes al transposón, que fueron posteriormente alineadas con el genoma del pez zebra (versión *Zv9/danRer7*) usando la herramienta “*Blat*” del sitio web de UCSC (<http://genome.ucsc.edu/>). Los lugares de inserción fueron confirmados bien por la coincidencia en la posición genómica de las secuencias procedentes de ambos extremos del transposón o, en el caso de que ambas posiciones no coincidieran o de que una de las dos no estuviera disponible, por la existencia de genes cercanos con patrones de expresión similares a los observados en las líneas correspondientes. A continuación, tras el proceso de secuenciación y alineamiento de secuencias, se procedió a analizar los patrones de expresión de genes cercanos al punto de inserción. En el caso de encontrarse coincidencias entre los patrones de expresión, se estableció una asociación entre una línea ED y un gen en concreto. Los patrones de expresión génicos fueron evaluados inicialmente usando los datos ya existentes (Bradford y cols., 2011; ZFIN) y confirmados más tarde mediante hibridación *in situ*. En caso de no encontrarse ningún candidato inicial, se realizaron hibridaciones *in situ* para entre 1 y 6 genes diferentes cercanos al punto de inserción.

2. Búsqueda de nuevos genes regulados por la vía de señalización del ácido retinoico.

2.1 Ensayos de inhibición y sobreactivación de la vía de señalización del ácido retinoico.

Con el fin de identificar líneas ED que mostraran una respuesta ante la inhibición o la sobreactivación de la vía de señalización del ácido retinoico, se realizaron tratamientos con dietilaminobenzaldehído (DEAB), un inhibidor competitivo reversible de la enzima retinaldehído deshidrogenasa (Begemann y cols., 2004) y ácido retinoico (AR) respectivamente, a embriones de 33 líneas ED.

Para los ensayos, los embriones fueron incubados en oscuridad a 28°C en medio E3 conteniendo ácido todo-trans retinoico (Sigma) a concentraciones de 4×10^{-8} M, 8×10^{-8} M y 16×10^{-8} M, procedente de una solución stock a 10^{-5} M diluida en DMSO. Los tratamientos con DEAB (Sigma Aldrich), por su parte, fueron llevados a cabo aplicando concentraciones de 4×10^{-5} M, 8×10^{-5} M y 16×10^{-5} M, procedente de una solución stock de 0,01M diluida en DMSO. Los embriones control fueron tratados en medio E3 al que se le añadió un volumen de DMSO equivalente al mayor volumen usado para preparar las diluciones arriba indicadas.

Para evitar los efectos teratogénicos de las drogas sobre el desarrollo temprano de los embriones y poder cuantificar apropiadamente los niveles de fluorescencia de los embriones transgénicos, se decidió realizar los tratamientos cuando éstos ya habían superado el estadio de gástrula y presentaban entre 3 y 5 somitos (11hpf aproximadamente). Los tratamientos se extendieron durante aproximadamente 13 horas, hasta que los embriones alcanzaron las 24hpf, momento en el que fueron anestesiados y posteriormente visualizados y fotografiados bajo la lupa de fluorescencia.

2.2 Cuantificación de los niveles de GFP.

Las fotografías fueron tomadas utilizando la lupa de fluorescencia y manteniendo el mismo objetivo (SDF PLAPO 1.6XPF) y las mismas condiciones de magnificación, tiempo de exposición y sensibilidad para cada línea ED analizada. Estas condiciones fueron ajustadas para cada línea en concreto debido a los diferentes niveles de intensidad en la señal de GFP basal existentes en los diferentes tejidos de las líneas transgénicas usadas y con el objetivo de evitar problemas de sobreexposición o subexposición.

Posteriormente se utilizó el programa de análisis de imagen ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) para cuantificar los niveles de fluorescencia de GFP mediante la medición de la intensidad de la luminosidad de cada uno de los tejidos donde se expresa este gen reportero en todas las líneas analizadas. A continuación, se calcularon las variaciones en la intensidad de la luminosidad procedente de cada uno de los tejidos

donde se expresa el reportero en cada línea analizada, en relación a la media de la intensidad medida en los embriones control tratados con DMSO mediante el test estadístico T-Student.

3. Hibridación in situ.

Para detectar el ARNm y poner de manifiesto los patrones de expresión de los genes de interés, se siguieron, salvo pequeñas modificaciones, protocolos publicados con anterioridad (Harland, 1991; Jowett y Lettice, 1994).

Las ribosondas fueron sintetizadas utilizando como molde el ADNc de cada gen de interés clonado en el vector *pGEM-T easy* (nº cat. A1360, Promega), tras ser linearizado usando una enzima de restricción con una única diana en el vector. Después de purificar el ADN linearizado con fenol y cloroformo y tras precipitarlo, la transcripción fue realizada utilizando las ARN polimerasas Sp6 o T7 (nº cat. 10881767001 y 10810274001, Roche Applied Science) y nucleótidos marcados con digoxigenina (Digoxigenin-11-UTP, nº cat. 11209256910, Roche Applied Science). A continuación, el ADN utilizado como molde fue degradado usando una DNasa (DNAsaI nº cat. 10104159001, Roche Applied Science). Finalmente, las sondas de ARN obtenidas fueron purificadas utilizando columnas de dextrano (Sephadex G-50 Medium, nº cat. G50150, Sigma-Aldrich) y sus concentraciones cuantificadas mediante un espectrofotómetro.

Tras ser rehidratados mediante lavados en soluciones con concentración creciente de PBTw, los embriones recibieron un tratamiento con 10 µg/ml de Proteinasa K y un paso de prehibridación previo a la hibridación con la sonda correspondiente a una concentración de 1 ng/µl. Posteriormente, fueron retirados los restos de sonda no unidos específicamente mediante lavados con soluciones con concentración decreciente de formamida. Más tarde, los embriones fueron bloqueados (2% suero de cabra (nº cat. B15-035, PAA laboratories, Inc) y 2 mg/ml albúmina de suero bovino (nº cat. A3294, Sigma-Aldrich) en PBTw. Para detectar la localización de las moléculas marcadas con digoxigenina, se incubaron los embriones en una dilución 1/5000 de anticuerpos anti-digoxigenina conjugados con la enzima fosfatasa alcalina (nº cat. 11093274910, Roche Applied Science), y se reveló la señal con NBT/BCIP (nº cat. 11681451001, Roche Applied Science) diluido en búfer alcalino (100mM Tris-HCl pH 9.5, 50mM MgCl₂, 100mM NaCl, 0.1% Tween-20). La reacción de revelado fue detenida cuando la señal alcanzó la intensidad deseada mediante lavados en PBS y los embriones fueron posteriormente fijados y conservados en PFA al 4% en PBS.

4. Inmunohistoquímica.

Los embriones de pez cebra utilizados para inmunohistoquímica fueron fijados a las 24hpf en PFA al 4% en PBS durante 2 horas y posteriormente lavados en PBTw durante la noche, para eliminar todos los restos de fijador. Tras ser bloqueados usando un búfer de bloqueo (PBTw, 2% suero de cabra, 2 mg/ml albúmina de suero bovino) durante 2 horas, los embriones fueron incubados a 4°C durante la noche con el anticuerpo primario correspondiente diluido, a la concentración adecuada, en solución de bloqueo (ver Tabla M1).

Anticuerpo	Dilución de uso
anti-BrdU (ratón)	1/200
anti-PH3 (conejo)	1/100
anti-Pdx1 (cobaya)	1/500
anti-ratón alexa 555	1/1000
anti-conejo alexa 555	1/1000
anti-cobaya alexa 555	1/1000
anti-cobaya alexa 488	1/1000

Tabla m1: Anticuerpos utilizados

Tras reiterados lavados con PBTw para eliminar el anticuerpo primario no unido específicamente y tras un nuevo paso de bloqueo, los embriones fueron incubados, de nuevo durante la noche, a 4°C y protegidos de la luz, con el anticuerpo secundario correspondiente para cada caso (ver Tabla M1). Tras un nuevo proceso de lavado del anticuerpo secundario usando PBTw, los embriones fueron embebidos en glicerol al 50% (nº cat. 1.0494.1000, MERCK) diluido en PBS, montados en un portaobjetos, cubiertos con un cubreobjetos y analizados al microscopio confocal (SP2, Leyca Microsystems). En todos los casos, los embriones fueron además teñidos con DAPI como marcador nuclear.

Para poner de manifiesto las células en proceso de proliferación, se incubaron embriones inyectados con TEAD-EnR y Mo-*yap1* en medio de cultivo con 10 mM de bromodeoxiuridina (BrdU) y 15% de DMSO durante 30 minutos. A continuación los embriones fueron fijados con PFA al 4% en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras la fijación y varios lavados con 0,1% PBTw, los embriones fueron digeridos con Proteinasa K a una concentración de 10 mg/ml durante 30 segundos y fijados de nuevo durante 20 minutos. Tras someter a los embriones a sucesivos lavados con PBTw para eliminar todos los restos de fijador, estos fueron posteriormente incubados con HCl 2N durante una hora, para ser posteriormente lavados con PBTw hasta restablecer un pH aproximado a 7. Tras este tratamiento, se utilizó un anticuerpo anti-BrdU (ver Tabla M1) y el proceso de inmunohistoquímica ya descrito para detectar las células que incorporaron BrdU durante el periodo de incubación.

5. Síntesis in vitro de ARN, microinyección de ARNm y morfolino Mo-yap1 y PCR a partir de embriones inyectados.

Para generar alteraciones en la función de *yap1*, se inyectaron 5nl de un morfolino de ensamblaje alternativo contra *yap1* (Mo-*yap1*, ver Tabla Supl. 2; Skouloudaki y cols., 2009), a una concentración de 2mM, en el vitelo de embriones en estadio de 1 ó 2 células. La actividad del morfolino fue confirmada mediante PCR utilizando cebadores específicos para el locus de *yap1* (*yap1_Fw* y *yap1_Rv*, ver Tabla Supl. 2) y ADNc como molde, sintetizado a partir de ARN extraído a embriones inyectados.

Para la síntesis del ARNm de *yap1*, se linearizó el plásmido con el ADNc correspondiente y se transcribió usando la ARN polimerasa Sp6. Tras un tratamiento con ADNasa, el ARN fue extraído con fenol y cloroformo, y al igual que para las ribosondas, el ARN obtenido fue purificado utilizando columnas de dextrano. Para rescatar el fenotipo producido por el morfolino Mo-*yap1*, se coinyectaron 50 pg del ARNm de *yap1* junto con el morfolino.

El ARNm de la proteína de fusión *Tead2*, procedente de ratón, con el dominio represor engrailed (TEAD2-EnR), fue sintetizado usando un vector de expresión descrito con anterioridad (Ota y cols., 2008). Para estos experimentos de reducción de la función de *Tead1*, se inyectaron 200 pg del ARNm de TEAD2-EnR en el vitelo de embriones en estadio de 1 ó 2 células, al igual que en el caso de Mo-*yap1*.

6. Ensayos de transgénesis con el elemento Sox9e1.

Para estos ensayos, la secuencia a testar fue seleccionada y clonada en el vector TOPO en el laboratorio del Dr. Jorge Ferrer en Barcelona. Así mismo, también se clonó en TOPO una versión de la misma secuencia a la que se le introdujo una mutación al sustituir tres nucleótidos (AAT por GCG) pertenecientes al sitio de unión de TEAD existente. Más tarde, ya en nuestro laboratorio, estas dos secuencias fueron recombinadas hacia un vector “*enhancer test vector*” (Fig. M2) diseñado para analizar la capacidad de una secuencia para actuar como elemento regulador. Este vector está compuesto por una secuencia de entrada o “*gateway cassette*”, donde se inserta el elemento a testar por medio de una reacción de recombinación con el vector TOPO. Esta secuencia de entrada está seguida por el promotor mínimo *gata2* y una proteína fluorescente verde mejorada (*enhanced GFP*, eGFP) como gen reportero. Además este vector cuenta con un potente elemento regulador de la expresión génica en el cerebro medio (*z48*), para ser utilizado como control interno de la eficiencia de la transgénesis. Todos estos elementos, previamente descritos (Bessa y cols. 2009), fueron ensamblados en un transposón *tol2* (Kawakami y cols., 2000). Posteriormente, el proceso de transgénesis realizado fue el mismo citado con anterioridad y los embriones fueron mantenidos en

cultivo hasta las 24 y 48 hpf a 28°C, momento en el que fueron observados y documentados bajo la lupa de fluorescencia.

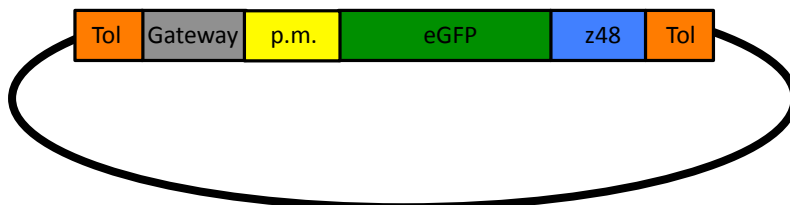


Fig. m2: “Enhancer Test Vector”. Representación esquemática del vector de transgénesis, basado en el transposón *Tol2*, utilizado para evaluar la actividad regulatoria del elemento Sox9e1, compuesto por el sitio de recombinación para clonar la secuencia a testar (caja gris), seguido del promotor mínimo del gen *gata2* (caja amarilla), el gen reportero GFP (caja verde) y el elemento regulador Z48 (caja azul).

7. Análisis 4C-seq (Circular Chromosome Conformation Capture with high-throughput Sequencing).

Los experimentos de 4C-seq fueron llevados a cabo, salvo pequeñas modificaciones, siguiendo protocolos previamente publicados (Dekker y cols., 2002; Hagege y cols., 2007; Noordermeer y cols., 2011; Splinter y cols., 2012). Para estos ensayos se utilizaron aproximadamente 500 embriones de 24 hpf, tanto silvestres como tratados con AR o DEAB. Tras fijar los embriones en una solución de PFA al 2% en PBS, éstos fueron disgregados utilizando un tampón de lisis (10mM Tris pH 8, 10mM NaCl, 0.3% NP-40, 1X Complete Protease Inhibitor, Roche) a 4°C y un homogenizador de Dounce. Posteriormente, la cromatina fue digerida con la endonucleasa DpnII (New England Biolabs) y a continuación ligada mediante el uso de la ADN ligasa T4 (Promega). El siguiente paso consistió en una nueva digestión usando la endonucleasa Csp6I (Fermentas, Thermo Scientific), seguida de una nueva ligación. Mediante la herramienta web Primer3 v. 0.4.0 (Rozen y Skaletsky, 2000), se diseñaron oligonucleótidos cercanos a los puntos del genoma a analizar (puntos de vista), el promotor de *mycb* (4C_mycb_Fw y 4C_mycb_Rv, ver Tabla Supl. 2) y el promotor de *myca* (4C_myca_Fw y 4C_myca_Rv, ver Tabla Supl. 2), conteniendo éstos los adaptadores Illumina en su secuencia, necesarios para el proceso de secuenciación. Las PCR fueron llevadas a cabo usando el kit de amplificación *Expand Long Template PCR System* (Roche) para cada punto del genoma a analizar, y los productos de PCR, purificados mediante el kit *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche). Finalmente, la concentración de las muestras fue determinada usando *Quanti-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit* (Invitrogen) y éstas fueron enviadas para su secuenciación.

El análisis de los resultados arrojados por el 4C-seq fue realizado siguiendo protocolos previamente descritos (Noordermeer y cols., 2011). Los datos crudos provenientes de la secuenciación fueron demultiplexados y alineados usando el genoma del pez cebra (versión Zv9/danRer7, Jul. 2010) como referencia. A continuación, se descartaron las secuencias localizadas en fragmentos flanqueados por dos sitios de restricción de la misma enzima o en fragmentos de menos de 40 pb de longitud. Las secuencias mapeadas fueron posteriormente convertidas a lecturas por extremo de fragmento de la primera enzima de restricción y la señal fue suavizada mediante un algoritmo de promedio por ventanas con desplazamiento. Además, para *mycb*, se utilizó otro algoritmo para hallar las diferencias de señal de las secuencias mapeadas provenientes de muestras de embriones tratados con RA y DEAB con respecto a las secuencias mapeadas provenientes de muestras de embriones silvestres. Finalmente, los datos suavizados fueron visualizados utilizando la herramienta “Genome Browser” disponible en el sitio web de UCSC (UCSC browser: <http://genome.ucsc.edu/>; Bernstein y cols., 2006; Mikkelsen y cols., 2007).

Resultados

1. Búsqueda de nuevos genes regulados por la vía de señalización del ácido retinoico.

1.1 Generación de la colección de líneas transgénicas ED de pez cebra.

En organismos pluricelulares, la regulación cis controla la correcta expresión génica en el espacio y en el tiempo. A pesar del papel esencial que juega la regulación cis en el desarrollo y la evolución de los organismos y en enfermedades humanas, nuestro conocimiento acerca de las secuencias regulatorias contenidas en el genoma está basado en el análisis de su actividad de manera individual y fuera de su contexto genómico. La regulación transcripcional es llevada a cabo por multitud de elementos cis-reguladores (ECR) que controlan la activación espaciotemporal génica y los niveles de expresión. Los genes con patrones de expresión complejos son regulados por múltiples ECRs distribuidos a lo largo de amplias distancias genómicas que conforman los llamados paisajes regulatorios o entornos genómicos (Ragvin y cols., 2010; Spitz y cols., 2003; de Laat y Duboule, 2013). Los límites de estos paisajes regulatorios están a menudo delimitados por aisladores, un tipo específico de elemento ECR que impide la interacción entre entornos genómicos adyacentes (Geyer y Corces, 1992; Chung y cols., 1993; Bell y cols., 2001; Martin y cols. 2011; Dixon y cols. 2012; Phillips-Cremins y Corces, 2013).

A pesar de que el uso de técnicas de secuenciación de nueva generación junto con ensayos de reporteros *in vivo* ha facilitado enormemente la identificación de ECRs (Visel y cols., 2009; Blow y cols., 2010), aún existe poca información acerca de la contribución de estas secuencias no codificantes a la expresión génica en sus contextos genómicos así como acerca de su organización en entornos regulatorios y de las consecuencias funcionales de su disrupción (Lettice y cols., 2002; Jeong y cols. , 2008; Ghiasvand y cols., 2011; Collette y cols., 2012; Visel y cols., 2010).

Para tratar de dar respuesta a estas preguntas se ha desarrollado en nuestro laboratorio un vector de disrupción de la expresión génica (Expression Disruption, ED) basado en el transposón Tol2, que alberga un potente aislador. Esta estrategia permite la detección y la disrupción *in vivo* de entornos regulatorios complejos.

El vector ED.

El vector ED es un transposón Tol2 (Kawakami y cols. 2000) que incluye un potente aislador flanqueado por dos genes reporteros fluorescentes bajo el control de promotores mínimos que funcionan como detectores de elementos reguladores (*enhancer traps*; Fig. r1). Así, el aislador debería causar la disrupción del entorno regulatorio en el que se integre. Además, la información regulatoria corriente arriba o corriente abajo del punto de inserción debería activar diferencialmente la expresión de los genes reporteros de la proteína fluorescente verde (Green Fluorescent Protein, GFP) o de la proteína fluorescente roja (Red Fluorescent Protein, RFP) que componen los *enhancer traps* posicionados a cada lado del aislador (ver Fig. m1).

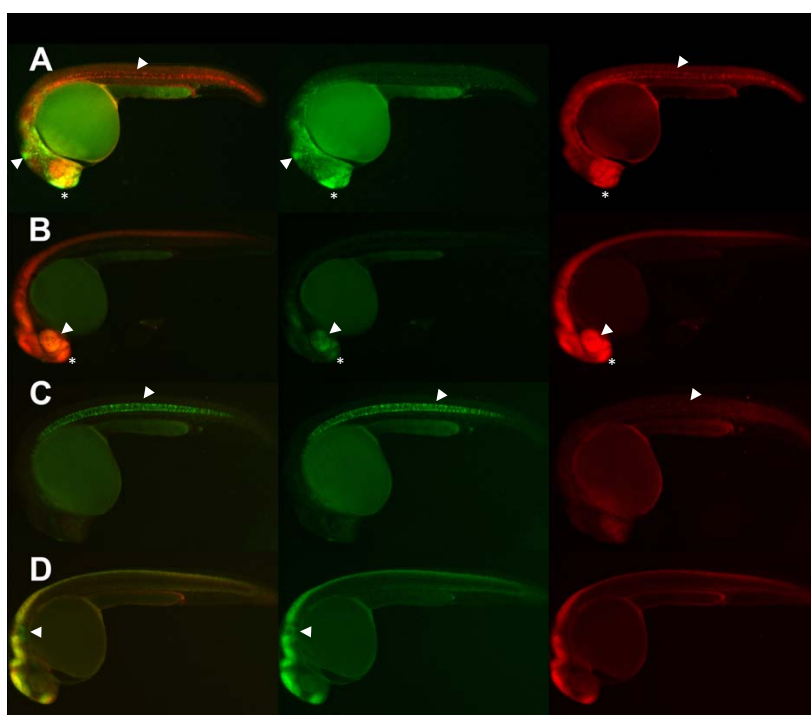


Fig. r3: Identificación de los lugares de inserción del vector ED y su distribución en el genoma del pez cebra. Representación esquemática del proceso de identificación de los lugares de inserción del vector ED por PCR inversa (A). Las inserciones mapeadas hasta el momento quedaron distribuidas al azar por todo el genoma del pez cebra, pudiendo encontrarse en todos los cromosomas exceptuando el 8 y el 10 (B) y tanto en regiones intergénicas como intrónicas y exónicas (C). Adaptado de Bessa y cols., 2013.

Mediante el uso del vector ED, coinyectándolo junto con el ARNm de la transposasa Tol2, se generaron 223 líneas transgénicas estables y se documentaron sus patrones de expresión de GFP y RFP a las 24 y 48 horas post fertilización (hpf; Tabla Suplementaria 1). La gran mayoría de las líneas mostraron diferentes patrones de expresión de las proteínas fluorescentes verde y roja (n=173, 78%; Fig. r2A-C), abarcando casos de expresión de GFP y RFP en diferentes tejidos (n=143; Fig. r2A) y casos en los que solamente se apreció expresión de GFP (n=18; Fig. r2C) o de RFP (n=12; Fig. r2B). Estos resultados sugieren que ambos “*enhancer traps*” son capaces de detectar diferentes secuencias regulatorias del entorno genómico original separadas por el aislador (Fig. r1). Una fracción de las líneas (n=50, 22%; Fig. r2D) mostraron una total coexpresión de GFP y RFP, lo que podría sugerir la existencia de redundancia en los elementos reguladores corriente arriba y corriente abajo del punto de inserción o, alternativamente, el fallo en la actividad del aislador en esas regiones genómicas en particular.

Identificación de los lugares de inserción del vector ED.

Para conocer la posición del punto de inserción del vector ED en el genoma de las líneas transgénicas y determinar si es capaz de recapitular el patrón de expresión de genes vecinos, se procedió al mapeo de cada una de estas líneas mediante PCR inversa. Así, por cada línea transgénica se extrajo ADN genómico que fue digerido con la enzima de restricción de corte frecuente Sau3AI, que reconoce la secuencia GATC. Tras la digestión y un posterior paso de ligación para circularizar los fragmentos digeridos, se procedió con dos rondas de PCR inversa anidadas, utilizando cebadores específicos para los extremos del transposón. Tras purificar y clonar en el vector TOPO el producto de PCR obtenido, las muestras fueron enviadas para su secuenciación utilizando el cebador GW1 (Fig. r3A). Para dar más fiabilidad a los resultados, todo el proceso de mapeo se realizó de forma paralela para las dos puntas del transposón, usando cebadores específicos para cada extremo (ver materiales y métodos).

Gracias a este método, se pudo determinar el punto de inserción del transposón en el genoma de 59 de las líneas transgénicas generadas (Tabla Suplementaria 1). Las inserciones mapeadas quedaron distribuidas por todo el genoma pudiendo encontrarse en todos los cromosomas exceptuando el 8 y el 10 (Fig. r3B). El 54% de los puntos de inserción quedaron

situados en regiones intergénicas del genoma, mientras que el 44% lo fue en regiones intrónicas y el 2% en regiones exónicas (Fig. r3C). A continuación, se compararon el patrón de expresión de esas líneas con el de los genes cercanos a las inserciones, pudiendo haberse establecido asociaciones entre una línea ED y un gen en concreto en 32 casos.

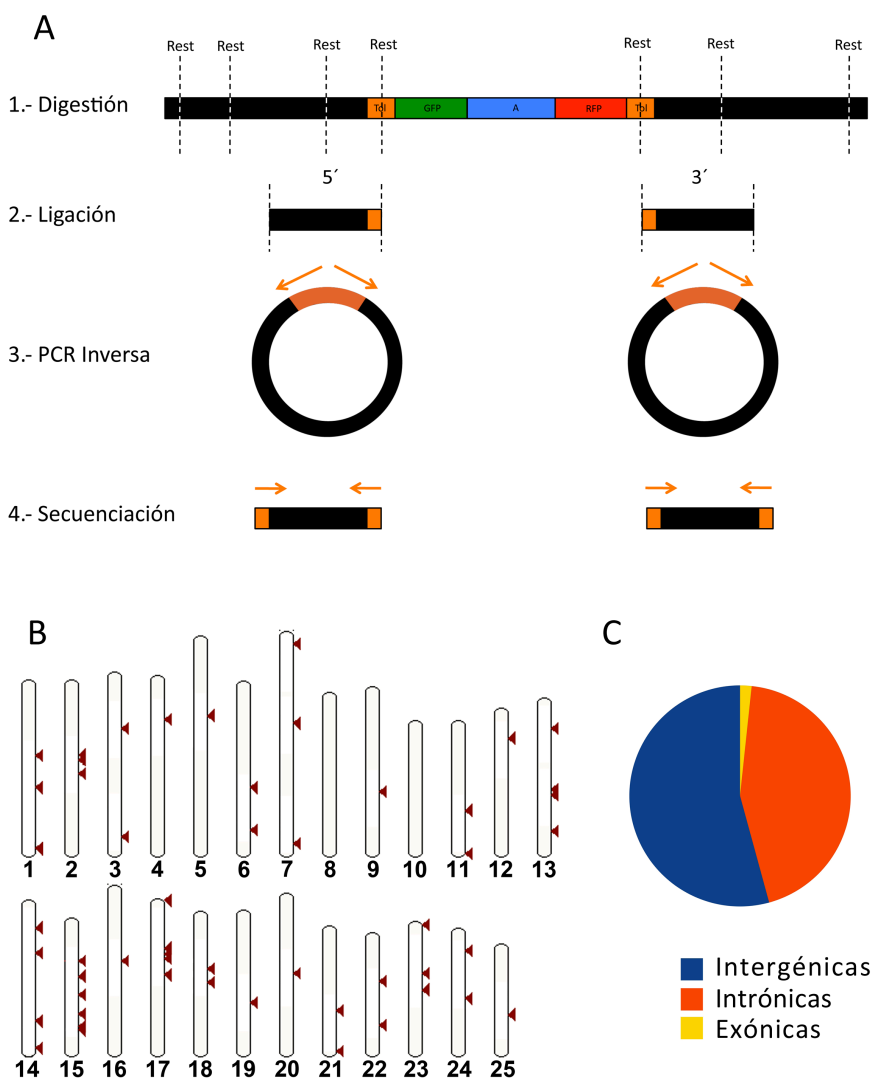


Fig. r3: Identificación de los lugares de inserción del vector ED y su distribución en el genoma del pez cebra. Representación esquemática del proceso de identificación de los lugares de inserción del vector ED por PCR inversa (A). Las inserciones mapeadas hasta el momento quedaron distribuidas al azar por todo el genoma del pez cebra, pudiendo encontrarse en todos los cromosomas exceptuando el 8 y el 10 (B) y tanto en regiones intergénicas como intrónicas y exónicas (C). Adaptado de Bessa y cols., 2013.

1.2 Ensayos de inhibición y sobreactivación de la vía de señalización del ácido retinoico.

El número de genes candidatos a responder a la vía de señalización del ácido retinoico (AR) crece rápidamente con el uso de las nuevas tecnologías que permiten la realización de técnicas cada vez más sensibles y a mayor escala. Por ejemplo, recientemente se han llevado a cabo cultivos embionarios de roedores combinados con el uso de tratamientos con AR para posteriormente realizarse análisis de microarray para identificar genes cuyos niveles de expresión fueran regulados por esta vía de señalización (Luijten y cols., 2010). En nuestro caso, para realizar una búsqueda de nuevos genes regulados por la vía de señalización del AR e intentar desentrañar los mecanismos moleculares que subyacen bajo esta regulación, hemos utilizado la colección de líneas transgénicas ED generadas en nuestro laboratorio. El vector ED integrado en cada una de estas líneas tiene la capacidad de leer *in vivo* el entorno regulatorio cercano al punto de inserción por medio de sus *enhancer traps*, lo que nos permite encontrar entornos regulatorios que responden a cambios en la actividad de la vía de señalización del AR y los genes asociados a estos entornos.

Líneas transgénicas usadas.

Al diseñar la estrategia experimental a llevar a cabo, se decidió utilizar solamente el reportero GFP presente en las líneas ED con la intención de simplificar los análisis. Para seleccionar el subconjunto de líneas ED que serían usadas en nuestros ensayos, del total de las 223 líneas generadas, se atendió principalmente a tres criterios. Se eligieron líneas ED cuyo patrón de expresión de GFP fuera restringido a tejidos u órganos concretos, sin presentar expresión de GFP difusa, débil o extendida por grandes áreas del embrión y que expresaran GFP a las 24hpf, pues es ese el estadio del desarrollo en el que se analizaría el efecto de la manipulación de la vía de señalización del AR. Además también se incluyeron con preferencia líneas previamente mapeadas y asociadas a algún gen de especial interés (Fig. r4; Tabla r1).

El análisis realizado a cada una de las líneas seleccionadas consistió en la exposición, durante un tiempo y en un estadio determinados, de los embriones a AR y al inhibidor de la

enzima retinaldehído deshidrogenasa (RALDH) 4-dietilaminobenzaldehído (DEAB), para incrementar o reducir respectivamente la actividad de la vía de señalización del AR. Como control, se usaron embriones tratados con dimetilsulfóxido (DMSO), compuesto usado

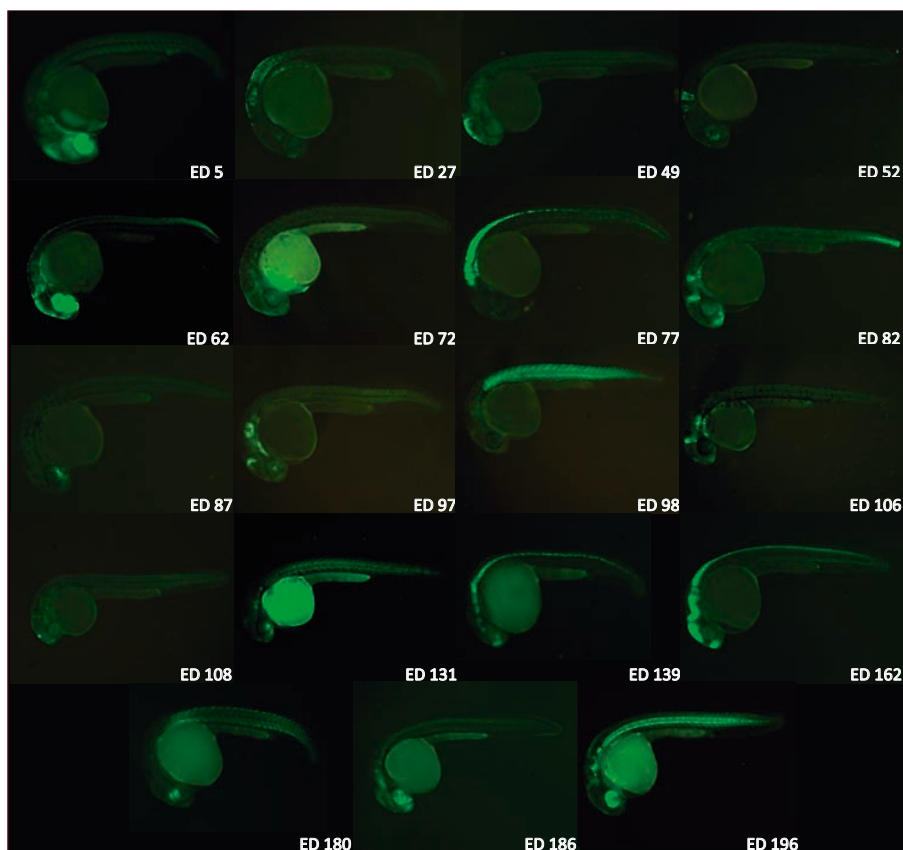


Fig. r4: Conjunto de líneas ED usadas en el estudio. Patrones de GFP correspondientes a las diferentes líneas transgénicas seleccionadas para los ensayos de manipulación de la vía de señalización del ácido retinoico.

como disolvente del AR y el DEAB. Esta exposición se llevó a cabo diluyendo los compuestos a diferentes concentraciones en el medio de cultivo de embriones de pez cebra y dejando desarrollarse a los embriones en estas condiciones durante 14 horas. Tras el tratamiento, se tomaron fotografías del patrón de expresión de GFP de cada uno de los embriones a 24hpf para detectar los posibles cambios en los niveles o patrones de GFP (ver materiales y métodos).

Línea	Gen asociado	Tejidos afectados	RA	DEAB
ED5	<i>Mych</i>	Glándula de la eclosión	=	-
ED27	<i>Dacha</i>	Vesícula ótica	-	+
ED49	<i>Axin2</i>	Cerebro medio	+	+
ED52	-	Ojo	+	+
		Rombómeros	+	=
ED62	<i>Rgma</i>	Cerebro anterior	-	+
		Rombómero	-	+
		Arcos branquiales	-	+
ED72	-	Ojo	-	-
		Glándula de la eclosión	-	+
ED77	<i>Fgfr</i>	Cerebro medio	+	-
		Sistema nervioso	-	+
		Arcos branquiales	+	-
ED82	<i>Fgf3</i>	Cerebro anterior	=	-
		Cerebro medio	+	+
		Arcos branquiales	+	-
ED87	-	Cerebro medio	-	-
ED97	<i>Mycb</i>	Vesícula ótica	-	+
		Arcos branquiales	-	=
ED98	-	Somitos	+	+
ED106	-	Cerebro anterior	-	+
ED108	<i>Appb</i>	Cerebro anterior	=	-
		Cerebro medio	+	-
ED131	-	Cerebro anterior	+	-
		Ojo	+	-
		Notocorda	+	-
ED139	-	Cerebro anterior	-	+
		Cerebro posterior	=	+
ED162	-	Cerebro anterior	+	-
		Cerebro medio	+	-
		Cerebro posterior	-	=
ED180	-	Notocorda	-	-
ED186	-	Cerebro posterior	-	-
ED196	-	Ojo	+	+
		Vesícula ótica	-	+
		Notocorda	+	+

Tabla r1: Líneas ED usadas, genes asociados y resumen resultados preliminares.

- Todo el proceso de análisis se dividió en dos etapas. En una primera fase, se realizó un cribado rápido de las líneas, utilizando un bajo número de embriones de cada una de ellas y una sola concentración tanto de AR como de DEAB. Tras un primer análisis visual, las

imágenes de los embriones de aquellas líneas que parecían presentar cambios en los niveles de GFP, fueron estudiadas con más detalle mediante un programa informático de análisis de imagen para poder cuantificar dichas variaciones. En la segunda fase, se usaron aquellas líneas que arrojaron resultados interesantes tras el análisis preliminar, para cuantificar los niveles de GFP tras repetir los tratamientos con RA y DEAB, utilizando en esta ocasión tres concentraciones diferentes y un mayor número de embriones.

Resultados de los tratamientos con RA y DEAB.

Tras el análisis visual preliminar que se realizó a un total de 33 líneas ED, se pudieron apreciar cambios en los niveles de GFP en 19 de ellas (Fig. r4), que fueron sometidas a la cuantificación de la intensidad de GFP por medios informáticos (ver anexo1). En resumen, todas estas líneas presentaron un aumento o una disminución en los niveles de GFP en algún tejido en concreto. Así mismo, muchas de las líneas presentaron tejidos en los que no se pudo detectar ninguna variación en los niveles de expresión de GFP, lo que podría indicar un efecto específico de tejido de los tratamientos con AR y DEAB (Tabla r1). A la vista de estos resultados, se seleccionaron dos de las líneas más interesantes (ED82 y ED97 asociadas a los genes *fgf3* y *mycb* respectivamente) para realizar un estudio más profundo que pudiera arrojar resultados estadísticamente significativos.

ED82 (fgf3).

Para confirmar los resultados obtenidos en el análisis preliminar y obtener un conjunto robusto de datos que nos permitiera confirmar los resultados preliminares, se repitieron los tratamientos utilizando tres diferentes concentraciones de AR (4×10^{-8} M, 8×10^{-8} M y 16×10^{-8} M) y de DEAB (4×10^{-5} M, 8×10^{-5} M y 16×10^{-5} M). Además, se fotografiaron un número suficiente de embriones que nos permitiera obtener resultados estadísticamente significativos y que más tarde fueron analizados mediante el uso de un programa informático de análisis de imagen.

Para la línea ED82 fueron analizados los niveles de GFP presentes en los arcos branquiales, la región caudal y el cerebro anterior, medio y posterior (Fig. r5). Los tejidos que arrojaron los resultados más interesantes fueron el cerebro medio y los arcos branquiales. En el caso del cerebro medio, la intensidad GFP aumentó significativamente tanto en los embriones tratados con AR como en los tratados con DEAB en todas las concentraciones testadas, con

respecto a los embriones control tratados con DMSO. Con respecto a los arcos branquiales, los embriones tratados con AR presentaron niveles de GFP significativamente mayores para las tres concentraciones. Este aumento parece comportarse de manera proporcional al incremento de la concentración de AR en el medio de cultivo. Por su parte, los embriones tratados con DEAB mostraron una disminución estadísticamente significativa en la expresión del reportero, solamente al ser incubados en la concentración más elevada ($16 \times 10^{-5} \text{M}$).

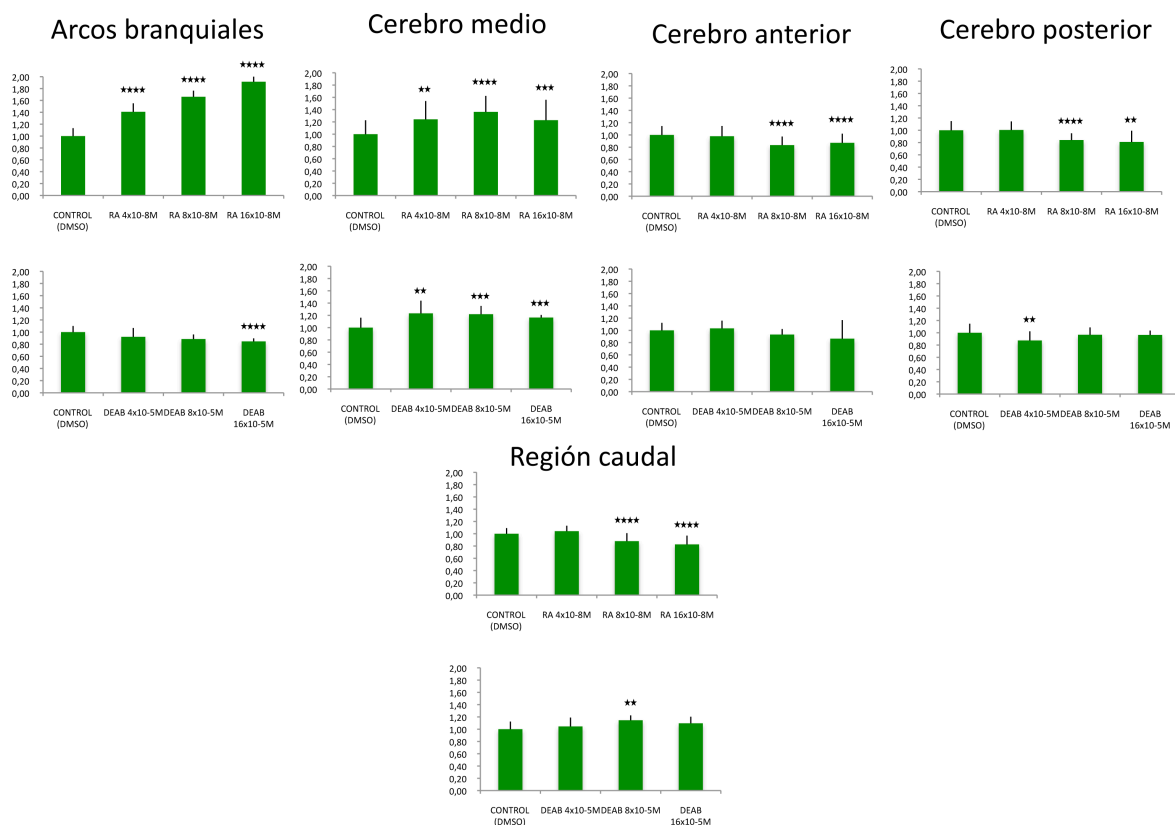


Fig. r5: Respuesta de la línea ED 82 a los tratamientos. Comportamiento de los diferentes tejidos que expresan GFP en ED 82 tras la exposición de los embriones a AR y DEAB. Las mayores diferencias significativas se obtuvieron en los arcos branquiales tras el tratamiento con AR (* = P<0,05; ** = P<0,01; *** = P<0,001; **** = P<0,0001).

ED97(mycb).

Al igual que para ED82, se analizaron en profundidad el patrón y los niveles de expresión de GFP de la línea ED97, tras la exposición de los embriones transgénicos a las condiciones experimentales previamente descritas.

En este caso, los tejidos analizados fueron los arcos branquiales, el cerebro medio y la vesícula ótica. Con la excepción de una pequeña disminución del 5% en la intensidad media de GFP en el cerebro medio con respecto a los controles, al tratar los embriones con 16×10^{-5} M de DEAB, no se encontraron, ni en este tejido ni en la vesícula ótica, cambios significativos en la intensidad de la fluorescencia en ninguna de las condiciones experimentales testadas (Fig. r6).

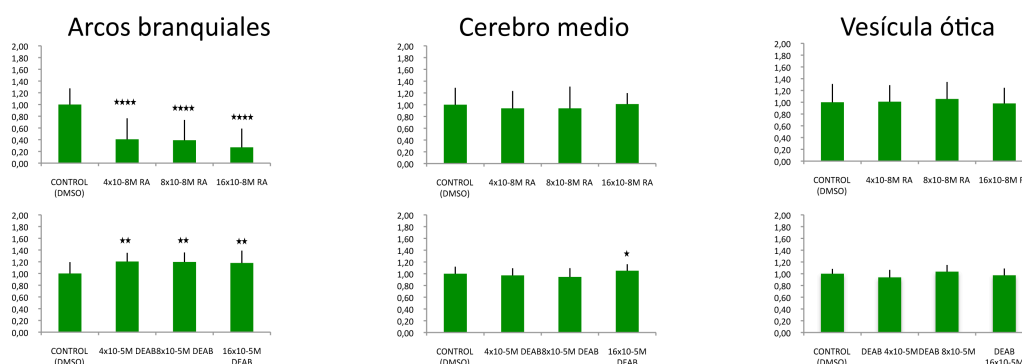


Fig. r6: Respuesta de la línea ED 97 a los tratamientos. Comportamiento de los diferentes tejidos que expresan GFP en ED 97 tras la exposición de los embriones a AR y DEAB. Los niveles de fluorescencia de los arcos branquiales mostraron una respuesta opuesta tras el tratamiento con AR o con DEAB. (* = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$; **** = $P < 0,0001$).

Los arcos branquiales sin embargo, mostraron una interesante respuesta ante la manipulación de la vía de señalización del AR. Al tratar los embriones con cualquiera de las tres concentraciones de AR, se produjo una gran disminución de más del 60% en la intensidad media de la fluorescencia emitida por el GFP con respecto a los controles. Esta

reducción parece no comportarse de manera proporcional a la concentración de RA, al menos en el rango de concentraciones testado, ya que se detectaron los mínimos niveles de fluorescencia desde la exposición de los embriones a la concentración más baja (Fig. r6).

El tratamiento con DEAB tuvo, en los arcos branquiales, el efecto contrario al tratamiento con AR. En este caso, los niveles medios de fluorescencia sufrieron un aumento de alrededor del 20%, alcanzándose ya, al igual que con el tratamiento con AR, la mayor respuesta desde la concentración más baja probada (Fig. r6).

Estos resultados en conjunto, indican que la incubación de embriones de la línea con RA o DEAB es capaz de disminuir o aumentar respectivamente los niveles de expresión de GFP de manera tejido específica ya que son los arcos branquiales el único tejido afectado.

Variación de los niveles de expresión del ARNm de mycb.

A la vista de la gran reducción en los niveles de fluorescencia de los arcos branquiales producida por el tratamiento con AR y el aumento de la misma tras el tratamiento con DEAB (Fig. r7A-C), se decidió examinar el patrón de expresión de *mycb*, el gen asociado a la línea ED97 y determinar si los niveles del transcrito presentaban un comportamiento similar a los del GFP. Para ello, se realizaron hibridaciones *in situ* a embriones tratados con AR y DEAB, usando una sonda específica para detectar el ARNm de *mycb*.

Los embriones tratados con 4×10^{-8} M de AR mostraron una reducción en los niveles de expresión de *mycb* en los arcos branquiales con respecto a los controles, llegando a hacerse, en ocasiones, prácticamente indetectables. Los embriones tratados con 4×10^{-5} M de DEAB presentaron, por su parte, un ligero aumento en los niveles del transcrito de *mycb* en el mismo tejido (Fig. r7D-F). Por lo tanto, podemos concluir que los cambios en los niveles de fluorescencia presentes en los arcos branquiales de embriones de la línea transgénica, producidos por la sobreactivación o la inhibición de la vía de señalización del AR, traen aparejados el mismo efecto sobre los niveles de transcripción de *mycb*. Así, estos resultados sugieren que esta vía de señalización es capaz de controlar los niveles de expresión del gen *mycb* específicamente en los arcos branquiales, en embriones de pez cebra a las 24hpf.

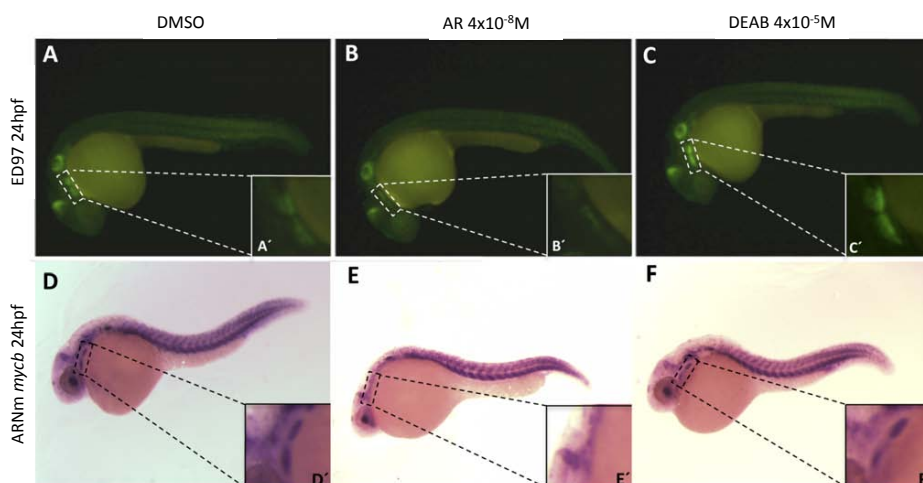


Fig. r7: Respuesta de los niveles de transcripción del reportero en ED 97 y del ARNm de *mycb* ante la manipulación de la vía de señalización del ácido retinoico. Patrones de expresión de GFP de embriones de la línea ED 97 de 24hpf tras ser incubados con AR (B) y DEAB (C) en comparación con los embriones control tratados con DMSO (A). La hibridación *in situ* realizada a embriones silvestres sometidos a las mismas condiciones experimentales, para poner de manifiesto el ARNm (D-F) de *mycb*, muestra el mismo comportamiento que el reportero con respecto a la expresión en los arcos branquiales (A'-F').

La reducción en los niveles fluorescencia de ED97 y de expresión de mycb en los arcos branquiales no es debido a la pérdida del tejido.

Tras los resultados comentados anteriormente, cabe cuestionarse si la reducción en la fluorescencia emitida por el GFP en de los arcos branquiales de embriones de la línea ED97, así como la disminución en los niveles de expresión de *mycb* en el mismo tejido tras tratar a los con AR, son provocadas por la pérdida del tejido debido a los efectos teratogénicos de la adición de esta sustancia al medio de cultivo durante el desarrollo.

Para responder a esta cuestión se realizaron tinciones inmunofluorescentes, usando un anticuerpo anti-Zn5, a embriones de la línea ED97 de 24hpf que fueron previamente incubados, al igual que en los ensayos anteriores, en medio de cultivo con una concentración de $4 \times 10^{-5} \text{M}$ de AR. El anticuerpo anti-Zn5 se une específicamente a los sacos

faríngeos, el componente endodérmico de los arcos branquiales (Piotrowski y Nusslein-Volhard, 2000), por lo que nos resulta de gran utilidad como marcador de este tejido.

Tras el análisis al microscopio confocal, pudimos comprobar como el tejido endodérmico que compone los sacos faríngeos, marcado con anti-Zn5, se encontraba presente tanto en los embriones control como en los embriones tratados con AR. Así mismo, comprobamos que las células que expresan GFP pertenecientes a los arcos branquiales, se encontraban igualmente presentes en los dos conjuntos experimentales de embriones (Fig. r8). Es de destacar que, a pesar de encontrarse ambos tipos celulares presentes en los arcos branquiales de los embriones tratados con AR, pudimos apreciar una reducción en el tamaño de los arcos branquiales.

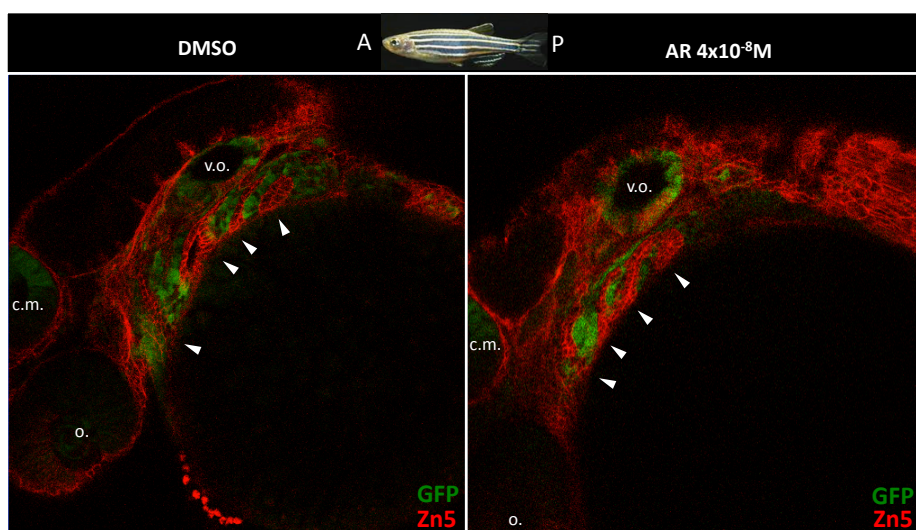


Fig. r8: Análisis de la distribución de la proteína Zn5, en embriones de la línea ED 97 tratados con AR, mediante inmunofluorescencia. Tanto los sacos faríngeos, marcados en rojo con el anticuerpo anti-Zn5 (punta de flecha), como las células de los arcos branquiales que expresan GFP en la línea ED 97, permanecen presentes tras someter a los embriones al tratamiento con AR a una concentración de 4×10^{-8} M. (c.m.: cerebro medio; v.o.: vesícula ótica; o.: ojo).

Tasa de proliferación.

Los genes de la familia *Myc* tienen un papel fundamental sobre la proliferación celular regulando la progresión del ciclo celular, la apoptosis y la diferenciación. Numerosos genes *Myc* actúan como reguladores transcripcionales activando o reprimiendo multitud de genes

diana (Dang CV, 1999; Oster SK y cols., 2000). Teniendo en cuenta las funciones conocidas de esta familia de genes y los numerosos trabajos publicados en los últimos años que relacionan una desregulación en los niveles de expresión de los genes *Myc* con multitud de tipos de cáncer y enfermedades genéticas humanas que afectan al desarrollo, decidimos examinar la tasa de proliferación celular en los arcos branquiales de embriones tratados con AR.

Para ello, se realizaron tinciones inmunofluorescentes a embriones de línea ED97, tras recibir el mismo tratamiento con AR descrito con anterioridad, usando como marcador de proliferación celular un anticuerpo anti-PH3, capaz de unirse específicamente a la histona

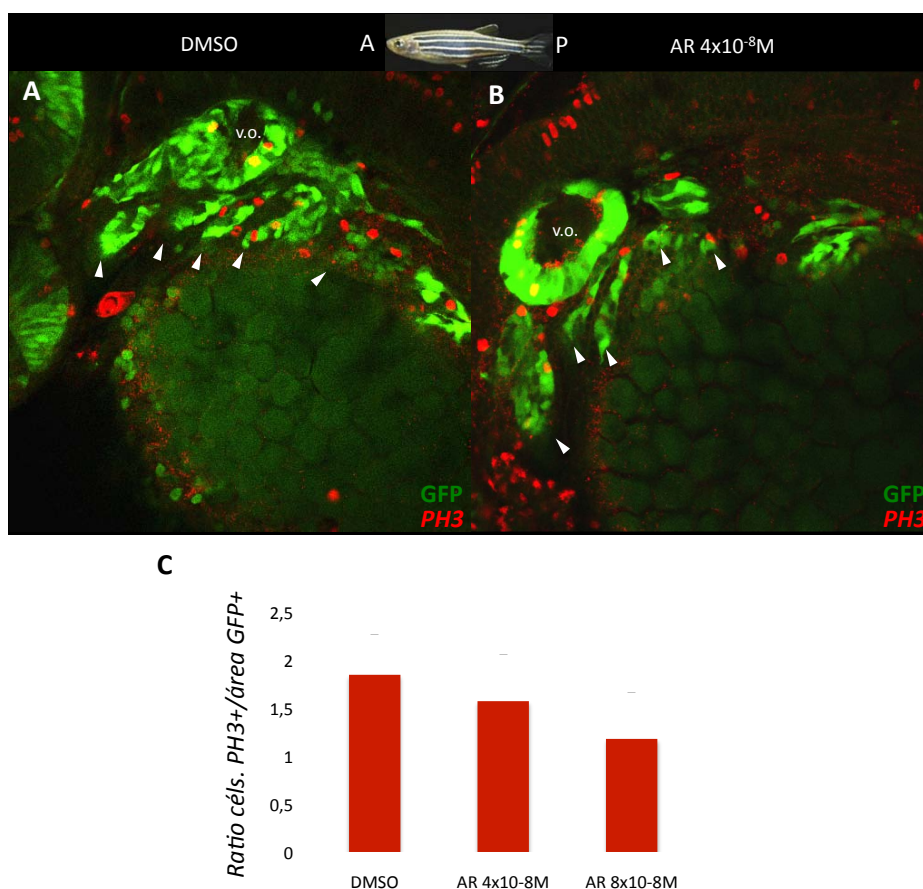


Fig. r9: Tasa de proliferación. Inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo anti-PH3. Comparación del número de células proliferativas (núcleos marcados en rojo) presentes en los arcos branquiales (puntas de flecha) de embriones tratados con AR (B) frente a embriones control (A). La representación gráfica muestra la tasa de proliferación relativa expresada como número de células PH3+ por unidad de área GFP+ (C). (v.o.: vesícula ótica).

H3 presente en las células mitóticas. Debido a que el tratamiento con AR parece producir en ocasiones la reducción del tamaño de los arcos branquiales, se expresó la tasa de proliferación relativa como número de células PH3+ por unidad de área GFP+. Como resultado, se obtuvieron menores tasas de proliferación relativa en embriones tratados con AR que en los embriones control incubados con DMSO. Además esta tasa de proliferación relativa disminuyó de manera proporcional a la concentración, siendo menor cuanto mayor fuera la concentración de AR en el medio de cultivo (Fig. r9). No obstante, este experimento se realizó utilizando un pequeño tamaño muestral que debería ser ampliado para mejorar el poder estadístico de estos resultados.

Estos resultados, teniendo en cuenta todo lo comentado, sugieren una posible reducción en la tasa de proliferación celular en los arcos branquiales en embriones de 24hpf al someterlos a la exposición a AR.

1.3 Análisis del entorno genómico de mycb y búsqueda de elementos reguladores relacionados con la respuesta al ácido retinoico.

Los resultados mostrados hasta el momento en este trabajo sugieren que la expresión de *mycb* está bajo la influencia de los cambios en los niveles de AR disponible para las células de los arcos branquiales en el pez cebra. Para analizar en más profundidad el entorno genómico de *mycb* se decidió utilizar la técnica 4C-seq (*Circular Chromosome Conformation Capture with high-throughput Sequencing*) y realizar una estimación de las secuencias del genoma que están en contacto directo con una secuencia de interés, como es en nuestro caso el promotor de *mycb*, entre las que teóricamente deberían encontrarse los elementos reguladores de este gen. En nuestro caso, decidimos hacer uso de esta técnica para analizar el entorno genómico de *mycb* (Fig. r10A) y su parálogo *myca* (Fig. r10B), tomando sus promotores como secuencias de interés (puntos de vista) para identificar posibles secuencias reguladoras de estos dos genes. Además también hemos contrastado estos resultados con los perfiles de acetilación de la lisina 27 de la histona H3 (H3K27ac) y de monometilación de la lisina 4 de la histona H3 (H3K4me1) (Bogdanovic y cols., 2012) cuyo enriquecimiento marca *enhancers* activos (Creyghton y cols., 2010; Hawkins y cols., 2011; Rada-Iglesias y cols., 2011; Bonn y cols., 2012).

Al analizar los resultados arrojados por el 4C, se pudo apreciar como los patrones de contactos de *mycb* y *myca*, a pesar de no ser exactamente iguales, presentaban características similares. Ambos promotores parecen mantener numerosas interacciones con secuencias situadas en el desierto génico contiguo a ambos genes y que en el caso del entorno genómico de *mycb* contiene el punto de inserción del vector en la línea ED 97.

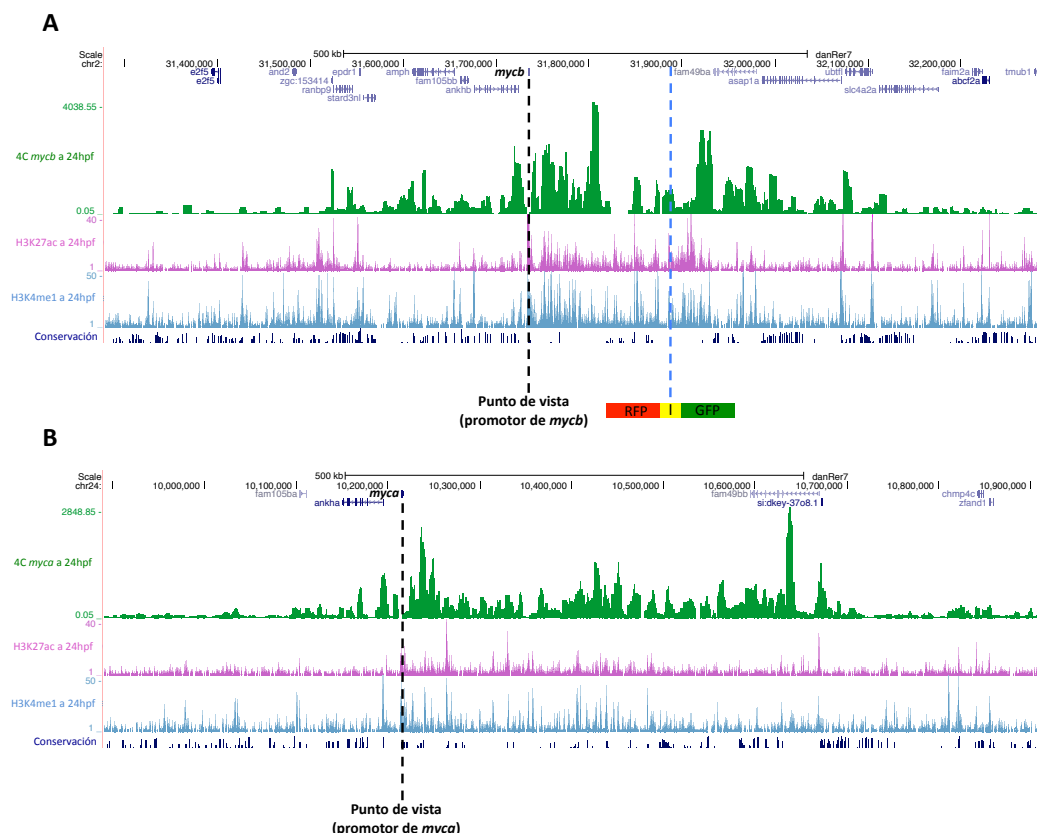


Fig. r10: Análisis 4C usando como puntos de vista los promotores de *mycb* y *myca*. Representación del entorno genómico de *mycb* (A) y *myca* (B) mostrando el patrón de posibles contactos (verde), tomando sus promotores como puntos de vista (línea discontinua negra), así como sus perfiles de H3K27ac (rosa), H3K4me1 (celeste) y el grado de conservación de la secuencia entre distintas especies de vertebrados (azul). La línea discontinua azul representa el punto de inserción del vector ED en la línea ED97.

Además, todas las secuencias con alta probabilidad de estar en contacto con el promotor analizado en cada caso, se encuentran restringidas a una región del genoma con una extensión de unas 600 kb, que engloba varios genes en ambos casos.

Finalmente, se procedió a determinar si se producen cambios en el patrón de contactos con promotor de *mycb* (Fig. r11) tras la manipulación de la vía de señalización del AR. Para ello, se realizaron ensayos de 4C a partir de cromatina extraída a embriones tratados con AR y

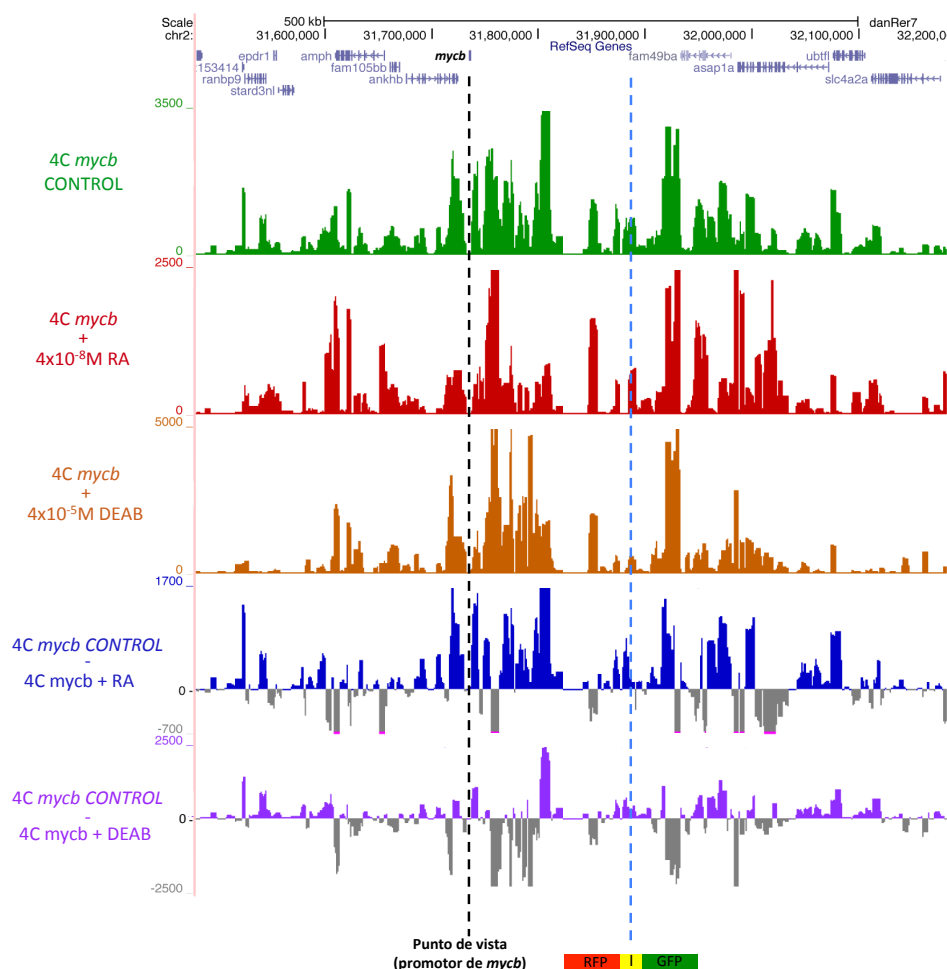


Fig. r11: Variaciones en el patrón de posibles contactos con el promotor de *mycb* tras la manipulación de la vía de señalización del ácido retinoico. Representación del entorno genómico de *mycb* mostrando los resultados de 4C obtenidos tomando su promotor como punto de vista (línea discontinua negra), a partir de embriones silvestres (verde) y de embriones tratados con AR (rojo) y DEAB (naranja). En azul y en morado se representan las diferencias de señal en las lecturas de secuenciación obtenidas tras realizar la diferencia entre el perfil de 4C obtenido a partir de embriones silvestres y el obtenido a partir de embriones tratados con RA y DEAB respectivamente. La línea discontinua azul representa el punto de inserción del vector ED en la línea ED97.

DEAB. Los resultados fueron entonces comparados con los obtenidos de los embriones silvestres mediante la utilización de un algoritmo que, en resumen, realiza la diferencia entre las lecturas de secuenciación de las muestras control y las provenientes de embriones tratados, lo que ayuda a poner de manifiesto aquellos picos de señal de secuenciación que se vean modificados, apareciendo o desapareciendo, tras los tratamientos.

Tras visualizar el patrón de posibles contactos del promotor de *mycb* (Fig. r11), tanto en la condición control (representado de color verde) como en las condiciones experimentales con AR (representado de color rojo) y DEAB (representado de color naranja) pudo observarse como éste varía apreciablemente. Estas variaciones fueron más fácilmente identificables gracias al tratamiento de los datos obtenidos con el algoritmo mencionado anteriormente para realizar la diferencia entre las lecturas de secuenciación y mediante el que se obtuvieron el conjunto de picos de señal de secuenciación que se vieron modificados en su intensidad, aparecieron o desaparecieron tras los tratamientos con RA (Fig. r11; color azul) y DEAB (Fig. r11; color morado). Estas modificaciones en el patrón de posibles contactos sugieren una remodelación de la arquitectura de la cromatina en esa zona del genoma controlada por la vía de señalización del AR, que podría estar causando la expresión diferencial de *mycb* en los arcos branquiales.

2. Ruta de señalización Hippo en el desarrollo del páncreas

2.1 Identificación de la ruta Hippo como vía de señalización esencial para el desarrollo del páncreas y de elementos reguladores relacionados con la regulación transcripcional de Sox9.

Estudios genéticos previos en humanos y experimentos de inactivación de genes en ratón han revelado multitud de factores de transcripción que regulan el desarrollo embrionario del páncreas (Fang y cols., 2010; Fang y cols., 2011). GATA6 (Pan y cols., 2011; Zaret y cols., 2008; Carrasco y cols., 2012), PDX1 (Xuan y cols., 2012; Lango y cols., 2011), HNF1B (Offield y cols., 1996), ONECUT1 (Stoffers y cols., 1997), FOXA1/FOXA2 (Haumaitre y cols., 2005), SOX9 (Jacquemin y cols., 2000; Gao y cols., 2008) y PTF1 (Piper y cols., 2002) por ejemplo, son esenciales para la especificación de las células embrionarias progenitoras pancreáticas multipotentes (pancreatic Multipotent Progenitor Cells, MPCs). Sin embargo, se conoce poco acerca de cómo esos factores de transcripción se organizan en redes regulatorias o qué secuencias de ADN son reconocidas por estos factores para activar los programas de desarrollo pancreático. Para comprender mejor estas cuestiones, el laboratorio del Dr. Jorge Ferrer (Imperial College de Londres e Instituto de Investigaciones Biomédicas August Pi i Sunyer de Barcelona) se centró en la disección de primordios pancreáticos procedentes de embriones humanos (*in vivo* MPCs) y en el posterior uso de células madre pluripotenciales para generar progenitores pancreáticos (*in vitro* MPCs). Usando estas MPCs pancreáticas en conjunto con técnicas de ChIP-seq, nuestros colaboradores han realizado un mapa de sitios de unión de un conjunto de factores de transcripción esenciales para el desarrollo pancreático temprano como son HNF1B (Offield y cols., 1996), ONECUT1 (Stoffers y cols., 1997), PDX1 (Xuan y cols., 2012; Lango y cols., 2011), GATA6 (Pan y cols., 2011; Zaret y cols., 2008; Carrasco y cols., 2012) y FOXA2 (Haumaitre y cols., 2005). Los cinco factores mostraron alto grado de coocupación, apareciendo habitualmente unidos en grupo. Dado que estudios previos muestran que se pueden reconocer elementos reguladores mediante la coocupación por múltiples factores de transcripción y por el enriquecimiento en histonas H3 metiladas en la lisina 4 (H3K4me1; Heintzman y cols., 2009), se seleccionaron 5.537 regiones genómicas que mostraban dicha característica *in vivo* en MPCs pancreáticas humanas procedentes de disección y que a su vez presentaban sitios de unión para al menos dos de los cinco factores de transcripción analizados tanto en MPCs pancreáticas *in vivo* como *in vitro*. Conforme a lo esperado, estas regiones

denominadas *enhancers* pancreáticos putativos, se localizan frecuentemente en las cercanías de genes expresados específicamente en MPCs pancreáticas humanas (Fig. r12).

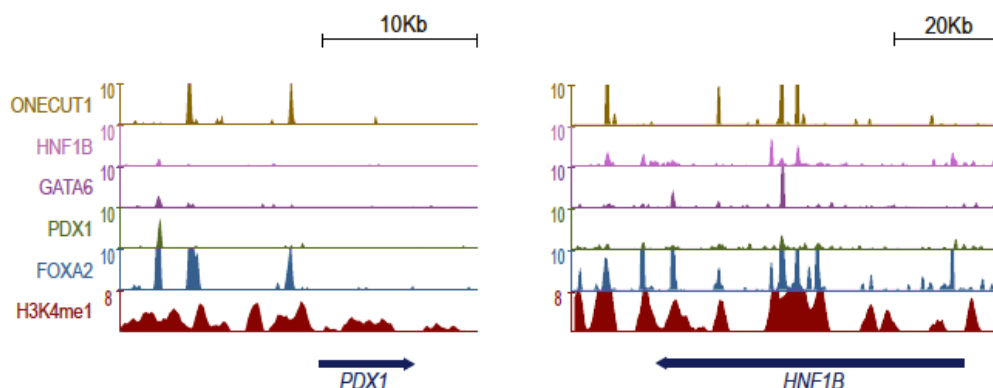


Fig. r12: Ejemplos de unión de factores de transcripción y de enriquecimiento en histonas metiladas H3K4me1 en las cercanías de dos genes clave para el desarrollo del páncreas, PDX1 y HNF1B. Datos obtenidos a partir de células MPC *in vivo*. Adaptado de Rodríguez-Seguí y cols., 2014.

Para validar funcionalmente estas secuencias, 36 de estos *enhancers* pancreáticos putativos fueron analizados mediante ensayos de luciferasa, mostrando 19 de ellos una significativa actividad reguladora de la expresión génica. Entre ellos, se validaron nuevas secuencias cis-reguladoras cerca de genes reguladores pancreáticos como *Hnf1b*, *Fgfr2*, *Nkx6.1*, *Sox9*, y *Pdx1*.

Gracias a esta colección de elementos reguladores nuestros colaboradores identificaron nuevos motivos de unión sobrerrepresentados para otros factores de transcripción pancreáticos conocidos. Además, también pudieron constatar la presencia de un alto número de sitios de unión para proteínas TEAD (gen homólogo de *Scalloped* en *Drosophila* y componente fundamental de vía de señalización Hippo), que se hallaron altamente concentrados en regiones ocupadas por todos los factores de transcripción analizados.

Posteriormente, nuestros colaboradores usaron ChIP-Seq para examinar la distribución a nivel genómico de las secuencias a las que TEAD1 aparece unido en MPCs pancreáticas *in vitro*. En concordancia con el hecho de que las proteínas TEAD son mediadores transcripcionales de la vía de señalización Hippo, detectaron una alta representación de TEAD1 unido a secuencias asociadas a conocidos genes diana de esta vía de señalización como son *Ctcf*, *Cyr61* y varios genes de la propia familia *TEAD*.

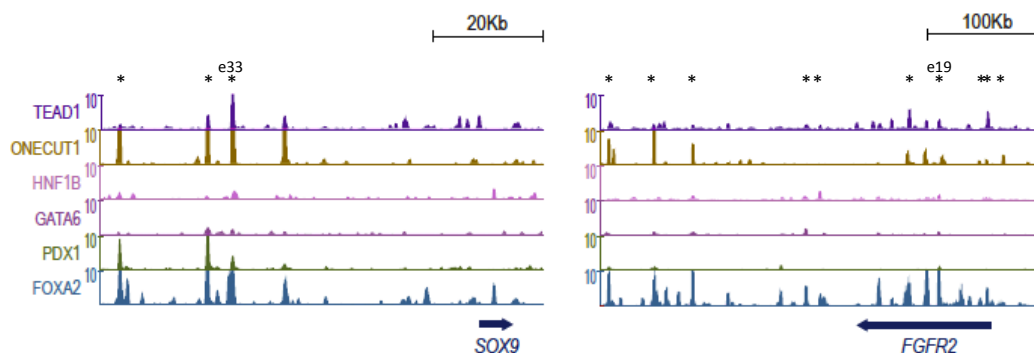


Fig. r13: Ejemplos de elementos reguladores, tanto conocidos como predichos (asteriscos), ocupados por TEAD-1 y otros factores de transcripción y situados en las cercanías de los genes reguladores del desarrollo pancreático SOX9 y FGFR2. Datos obtenidos a partir de células MPC *in vitro*. Adaptado de Rodríguez-Seguí y cols., 2014.

Entre los genes reguladores pancreáticos que presentan elementos reguladores unidos a TEAD1 se encuentran *SOX9* y *FGFR2* (Fig. r13) y otros como *RBPI*, *FZD5/7/8*, *FRZB*, *JAG1*, *NKX6.1*, *HHEX*, *GATA4*, *GATA6*, *FOXA2* y *HES1*.

En conjunto, estos resultados indican que TEAD1 es un componente integral de elementos reguladores de la transcripción en el páncreas en desarrollo y apuntan a la existencia de una función de las proteínas TEAD en el desarrollo de las MPCs pancreáticas.

Las proteínas TEAD interactúan con la forma activa de del coactivador Yes-associated protein (YAP), que es fosforilada y retirada del núcleo por la activación de la vía de señalización Hippo (Heinz y cols., 2010). El análisis de la localización de YAP, mediante inmunotinciones utilizando un anticuerpo específico para esta proteína, mostró que en embriones de ratón en estadios E10,5-E14,5 YAP se encuentra restringida al núcleo de las MPCs pancreáticas, mientras que se encontraba desplazada al citoplasma en células *Pdx1*⁺ en proceso de diferenciación. Además, Yap no ha sido detectada en células diferenciadas expresando insulina o glucagón (Fig. r14). Estos resultados sugieren que la localización nuclear de Yap está restringida a las células MPCs.

Además, en concordancia con anteriores estudios realizados con células epiteliales de mamíferos, pudieron detectar mediante ChIP-qPCR la presencia de YAP en la mayoría de regiones analizadas unidas a TEAD1 en células MPCs pancreáticas. Así, el coactivador YAP se

une a *enhancers* pancreáticos unidos a TEAD1 y muestra una expresión específica en células MPCs del páncreas embrionario. Este hallazgo sugiere una función de TEAD1 dependiente de YAP y restringida a células MPCs pancreáticas que más tarde se disipa en linajes pancreáticos diferenciados.

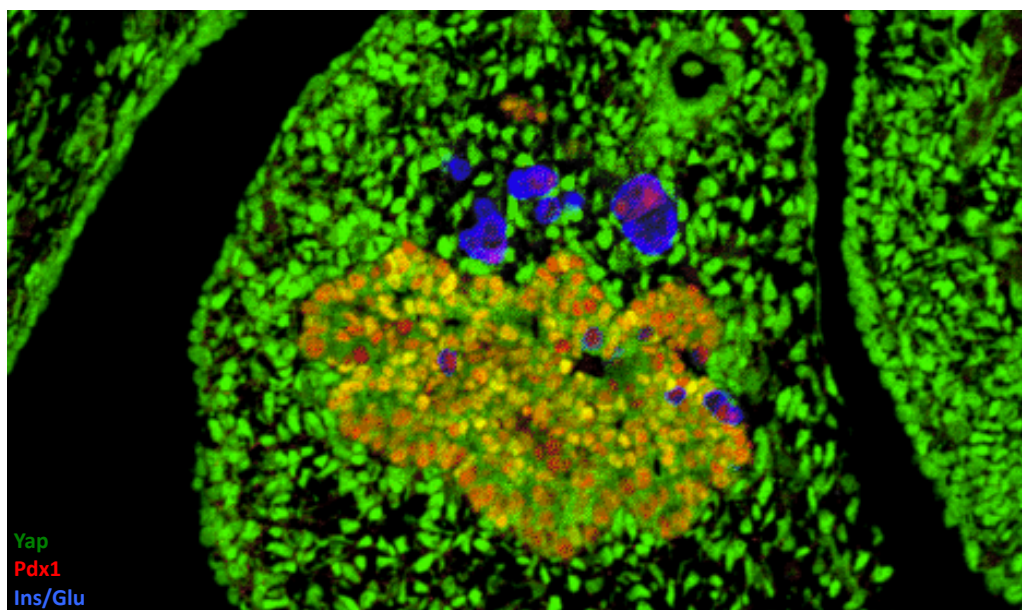


Fig. r14: La expresión de Yap se encuentra restringida al núcleo de las MPCs en embriones de ratón. Tinción inmunofluorescente de páncreas de embrión de ratón. La localización de Yap se muestra marcada en verde, la de Pdx1 en rojo y la de Insulina y Glucagón, marcadores presentes en células diferenciadas, en azul. Adaptado de Rodríguez-Seguí y cols., 2014.

2.2 El elemento regulador Sox9e1.

Para conocer más acerca de la importancia biológica de la unión de TEAD1 a elementos reguladores con actividad específica en el páncreas en desarrollo, se analizó en nuestro laboratorio la actividad *enhancer in vivo* de las secuencias reguladoras identificadas por nuestros colaboradores utilizando como modelo animal el pez cebra.

Estudios genéticos en ratón muestran que Sox9 es esencial para la renovación de las células progenitoras pancreáticas multipotentes (Jacquemin y cols., 2000; Gao y cols., 2008). Para

examinar la posible actividad *enhancer* de una de las secuencias identificadas en las cercanías de *Sox9*, se inyectaron embriones de pez cebra con un vector diseñado en nuestro laboratorio, conteniendo un *enhancer* pancreático putativo del entorno genómico de *Sox9* (*Sox9e1*) al que se une TEAD1, junto a un promotor mínimo dirigiendo la expresión de la proteína fluorescente verde (Green Fluorescent Protein, GFP). Además, este vector está integrado por el elemento regulador Z48 que dirige la expresión de GFP en el cerebro medio y cuya actividad fue utilizada como control de transgénesis (ver materiales y métodos). Además, se realizaron inyecciones utilizando una versión modificada del vector en el que se introdujo una mutación en el sitio de unión de TEAD al elemento *Sox9e1*.

A las 48hpf una fuerte expresión de GFP era claramente visible en el dominio pancreático embrionario en el 93,5% (n=106) de los embriones inyectados con el vector correspondiente al elemento silvestre (Fig. r15a y c). Con respecto al mutado, el 42% de los embriones inyectados no presentaban expresión detectable de GFP en el páncreas (Fig. r15b y c), mientras que el 58% presentaban bajos niveles de GFP (n=138).

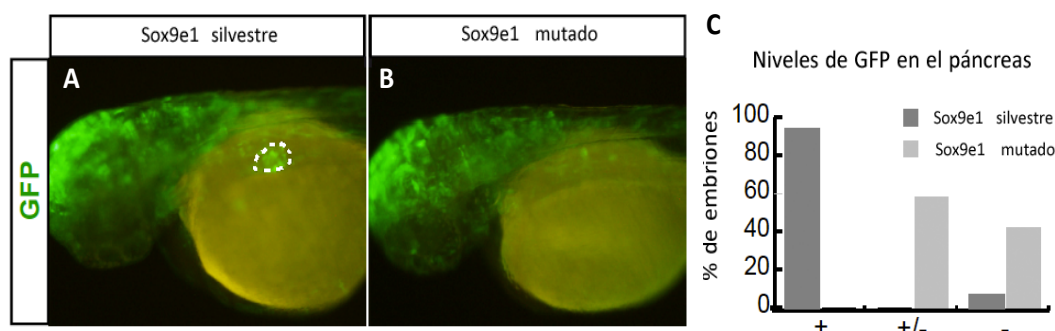


Fig. r15: Test de actividad reguladora de la transcripción mediante ensayos de transgénesis para el elemento *Sox9e1*. La mayoría de embriones inyectados con el vector de transgénesis conteniendo el elemento *Sox9e1* mostraron altos niveles de expresión de GFP en el páncreas (A, línea blanca punteada), mientras que aquellos en los que el vector contenía la forma mutada de *Sox9e1* mostraron una débil o ausente expresión de GFP en el páncreas (B). Las imágenes fueron obtenidas de embriones de 48 hpf. La expresión de GFP en el cerebro medio, es debida al elemento regulador Z48, cuya actividad es usada como control de transgénesis. La gráfica (C) muestra el recuento de entre 110 y 140 embriones por condición experimental. +, +/- y - representan, respectivamente, niveles de expresión de GFP altos, débiles y ausentes en el páncreas.

Estos resultados confirman que el elemento Sox9e1 es un *enhancer* que dirige la expresión génica en el páncreas y que su actividad requiere del sitio de unión de TEAD1. Además, el hecho de que este elemento se encuentre situado en el entorno genómico de *Sox9*, sugiere que la secuencia Sox9e1 puede ser un elemento regulador de este gen, requerido para su expresión en el páncreas.

2.3 Manipulación genética de la vía Hippo.

Para analizar la función *in vivo* de las proteínas Yap y Tead en el desarrollo del páncreas se procedió a realizar alteraciones genéticas en el pez cebra mediante el uso de un morfolino de ensamblaje alternativo contra *yap1* (Mo-*yap1*) así como de la expresión de una forma dominante negativa de la proteína TEAD1 (TEAD-EnR) a la que se le fusionó el dominio represor transcripcional de la proteína Engrailed (Han y Manley, 1993).

El morfolino de ensamblaje alternativo, fue diseñado contra el punto de empalme situado entre los exones 2 y 3 dando como resultado una forma defectuosa de la proteína Yap1 sin el exón 2. Tras la inyección del morfolino contra *yap1*, se procedió al análisis del fenotipo de los embriones morfantes de 24hpf. Como resultado, los embriones morfantes presentaban un fenotipo observable similar a los ya publicados (Skouloudaki y cols., 2009) caracterizado por una reducción de la longitud del cuerpo y una evidente curvatura de la región caudal (Fig. r16a). También se pudo observar una disposición defectuosa de la notocorda en zig-zag, característica fenotípica no descrita con anterioridad (Fig. r16b).

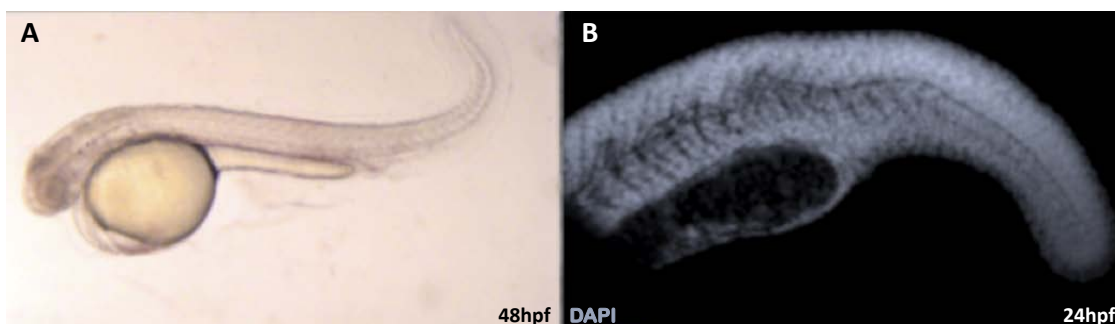


Fig. r16: Evaluación de la efectividad del morfolino Mo-*yap1*. Los embriones morfantes presentaron un acortamiento de la longitud del cuerpo y una evidente curvatura de la región caudal (A) además de una disposición anómala de la notocorda en zig-zag (B).

Además, se analizó la actividad del morfolino mediante PCR (Fig. r17) usando cebadores específicos para el locus correspondiente a *yap1*. Como molde se usó ADNc sintetizado a partir de ARN extraído de embriones inyectados con el morfolino y de embriones silvestres como control. Según lo esperado, se obtuvo una banda de 1142 pb correspondiente al ensamblaje alternativo, en contraste con el tamaño de la banda correspondiente a la forma silvestre del transcrito de 1378 pb.

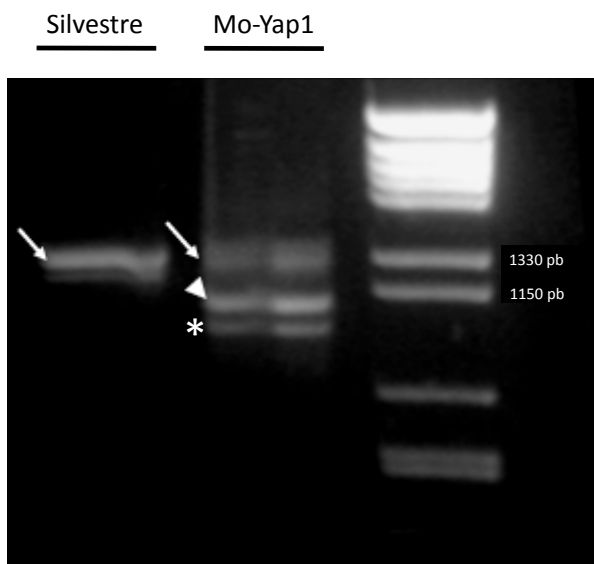


Fig. r17: Análisis de la actividad del morfolino Mo-yap1 mediante PCR. Además de la banda de 1378 pb correspondiente a la forma silvestre del transcrito de *yap1* que también se encontró presente en la muestra procedente de embriones silvestres (flechas), se pudo amplificar, a partir de muestras procedentes de embriones inyectados con Mo-yap1, una segunda banda de 1142 pb (punta de flecha) correspondiente al ensamblaje alternativo del transcrito producido por la actividad del morfolino. Además, se obtuvo una tercera banda (asterisco) que atribuimos a una isoforma distinta del transcrito.

2.3.1 Efectos de la inhibición de la actividad de *yap1* sobre el desarrollo del páncreas del pez cebra.

Para evaluar el efecto de la inhibición de la actividad de *yap1* sobre el páncreas en desarrollo, se realizaron hibridaciones *in situ* utilizando una sonda de ARNm contra insulina. Así se pudo poner de manifiesto una evidente reducción en el tamaño del páncreas de los embriones morfantes, acompañada en ocasiones de expresión ectópica de insulina, que afecta al 65% de los embriones inyectados (Fig. r18a-c). Este efecto pudo ser parcialmente

revertido mediante la coinyección de Mo-*yap1* junto con el ARNm de *yap1*, sintetizado *in vitro* e insensible al morfolino, al pasar del 65% de embriones con hipoplasia pancreática a sólo un 18%, lo que confirma la especificidad del morfolino (Fig. r18f). Un análisis más detallado mediante microscopía confocal reveló una reducción en el número de células diferenciadas que expresan insulina en embriones inyectados con Mo-*yap1* en comparación con los controles (Fig. r18d y e).

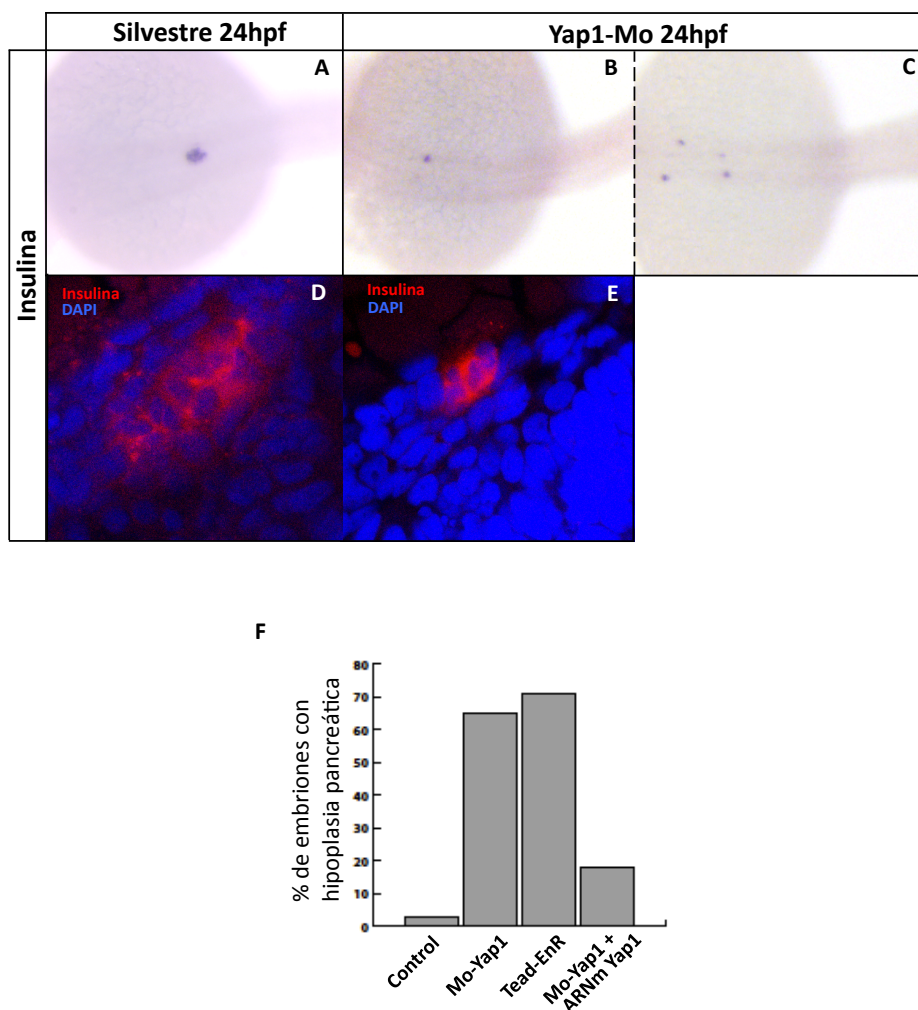


Fig. r18: El patrón de expresión de insulina resulta afectado en embriones inyectados con Mo-*yap1*. Vista dorsal del patrón de expresión de insulina en embriones de 24 hpf inyectados con el morfolino Mo-*yap1*, mostrando hipoplasia pancreática (B) y expresión ectópica de insulina (C) en comparación con los controles (A) no inyectados. Un análisis detallado al microscopio confocal revela una evidente reducción del número de células expresando insulina (rojo) en los embriones morfantes (E) en comparación con los controles (D). Estos embriones han sido también teñidos con el marcador nuclear DAPI (azul). La gráfica (F) muestra los porcentajes de embriones con hipoplasia pancreática en las diferentes condiciones experimentales.

Para dilucidar si las características fenotípicas producidas por la inhibición de la actividad de *yap1* son un fenómeno exclusivo de las células pancreáticas productoras de insulina, se procedió a analizar los patrones de expresión de genes específicos de otros tipos celulares endocrinos. Para ello se realizaron hibridaciones *in situ* utilizando sondas de ARNm contra glucagón y somatostatina, observándose una similar reducción en el número de células que expresan estos genes (Fig. r19A-F). Así mismo, el patrón de expresión del marcador de células pancreáticas exocrinas *tripsina*, presentaba un aspecto similar al del resto de marcadores pancreáticos, con una reducción del área marcada por la sonda y expresión ectópica en embriones de 72hpf inyectados con *Mo-yap1*, en comparación con los embriones control (Fig. r21a-c). En conjunto, estos resultados indican que la manipulación

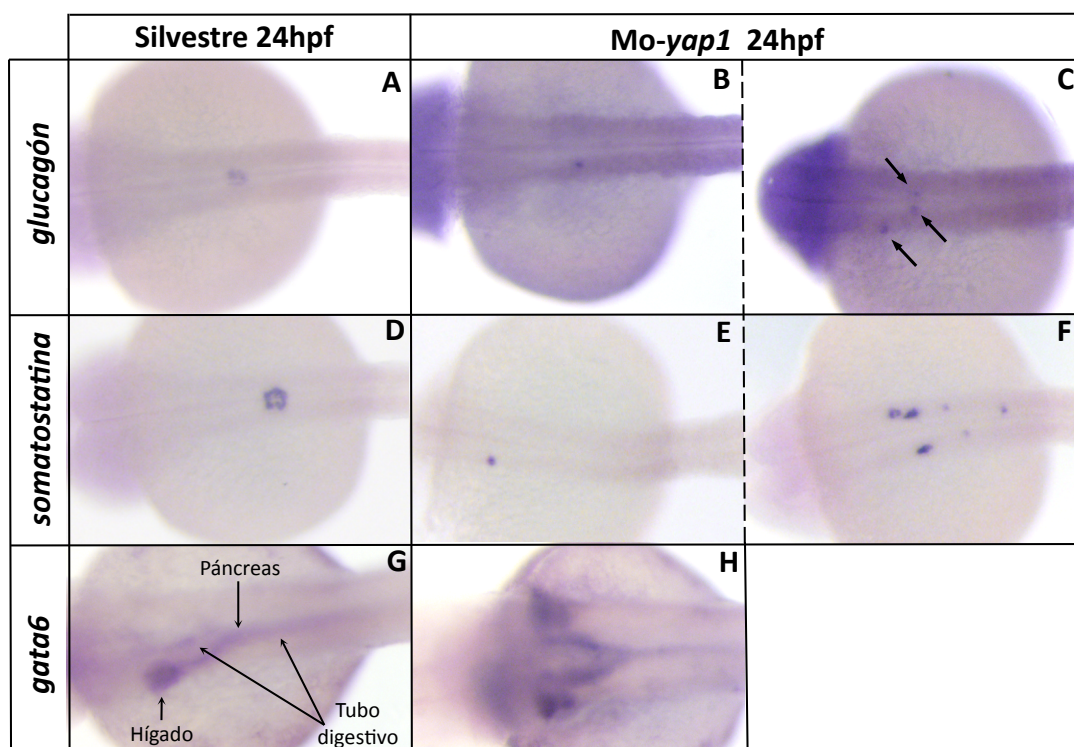


Fig. r19: Diversos marcadores pancreáticos endocrinos así como la disposición del endodermo resultan igualmente afectados tras la manipulación de la vía Hippo. Vista dorsal del patrón de expresión de *glucagón* (A-C), *somatostatina* (D-F) y *gata6* (G y H), detectado por hibridación *in situ*, de embriones de 24 hpf tras ser inyectados con el morfolino *Mo-yap1* (B, C, E, F y H), en comparación con los controles (A,D y G).

de la actividad de *yap1* no sólo tiene efectos sobre el desarrollo de las células β , sino que otros tipos celulares tanto endocrinos como exocrinos resultan igualmente afectados.

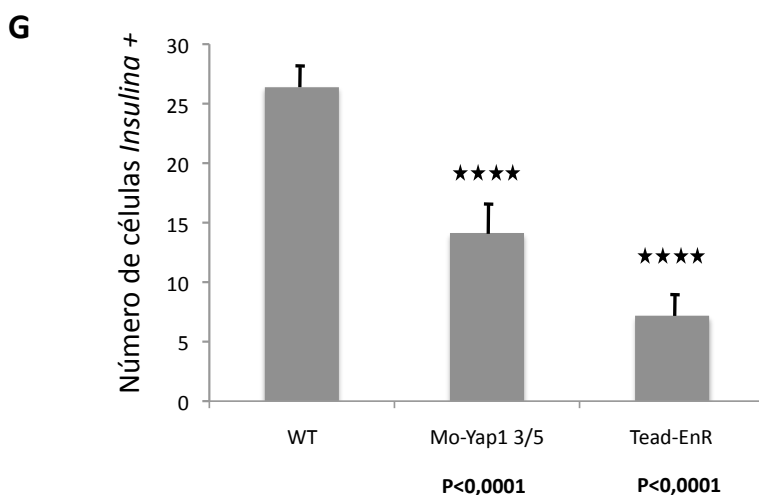
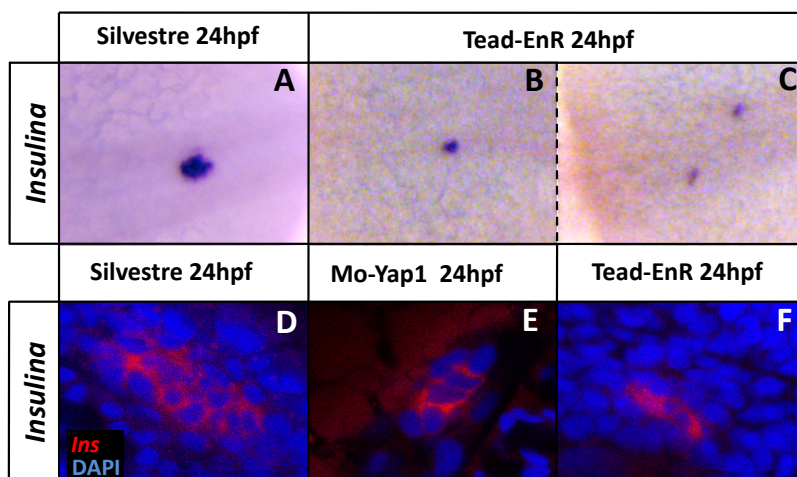


Fig. r20: Efectos de la reducción de la actividad de TEAD sobre el desarrollo pancreático. Vista dorsal del patrón de expresión de *insulina* detectado por hibridación *in situ* en embriones de 24hpf inyectados con TEAD-EnR mostrando hipoplasia pancreática (B) y expresión ectópica de *insulina* (C) en comparación con el patrón silvestre (A). El análisis detallado al microscopio confocal mediante hibridación *in situ* con marcaje fluorescente pone de manifiesto la reducción en el número de células productoras de *insulina* al manipular la vía Hippo (E y F) en comparación con el número de células en los animales silvestres (D). La gráfica (G) muestra los resultados del recuento del número de células productoras de *insulina* en las diferentes condiciones experimentales. (**** = P<0,0001).

Dado que en estudios anteriores se ha puesto de manifiesto que el gen *gata6* se expresa fuertemente en el endodermo de pez cebra (Reiter y cols., 2001), se utilizó una sonda de ARNm contra el transcrito de este gen para analizar los efectos del morfolino sobre el endodermo. Los embriones morfantes presentaban una duplicación del eje del endodermo con la existencia de estructuras anatómicas repetidas como el tubo digestivo, el hígado o el páncreas (Fig. r19g y h). Este fenómeno podría explicar la expresión ectópica de marcadores pancreáticos debido a un efecto temprano de la inhibición de la actividad de *yap1* sobre la especificación del endodermo durante la gastrulación.

En concordancia con lo esperado, al ser YAP un elemento coactivador de TEAD, embriones inyectados con el ARNm que codifica la versión dominante negativa de la proteína TEAD (TEAD-EnR) presentaban las mismas características fenotípicas que ante la inhibición de la actividad de *yap1*, con una marcada reducción en el número de células β y la existencia de expresión ectópica de marcadores pancreáticos tanto endocrinos como exocrinos, a la luz de los patrones de expresión de insulina (Fig. r20a-g) y de tripsina (Fig. r21a-e).

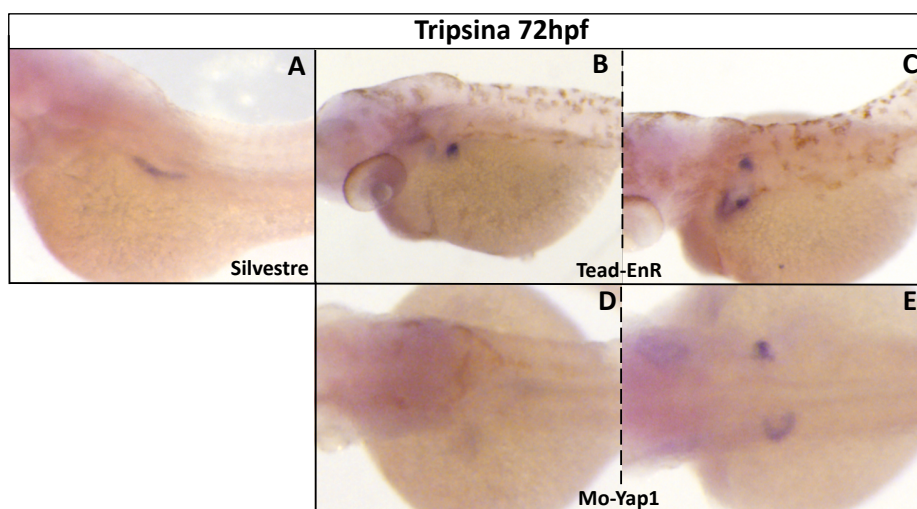


Fig. r21: Efectos de la manipulación de la vía Hippo sobre el desarrollo del páncreas exocrino. Vista dorso-lateral del patrón de expresión del marcador exocrino tripsina en embriones de 72hpf inyectados con Mo-*yap1* (D y E) y con TEAD-EnR (B y C), mostrando hipoplasia pancreática y expresión ectópica, en comparación con el patrón de expresión en animales silvestres (A).

2.3.2 Efectos de la manipulación genética de la vía Hippo sobre los progenitores pancreáticos.

Para intentar desentrañar las causas del descenso en el número de células pancreáticas tras la inhibición de la actividad de *yap1* y *TEAD* se procedió al análisis del efecto de estas manipulaciones sobre las células MPCs pancreáticas en el pez cebra. Dado que estudios anteriores en ratón demuestran que *Pdx1* es transcripcionalmente activo en el endodermo, donde define las regiones que más tarde formarán el páncreas (Jonsson y cols., 1994; Offield y cols., 1996; Jorgensen y cols 2007; Frogne y cols., 2012) y que en el páncreas en desarrollo *Sox9* se expresa en un subconjunto de células progenitoras pluripotenciales *Pdx1*⁺ mitóticamente activas (Seymour y cols., 2007), se realizaron hibridaciones *in situ* utilizando una sonda de ARNm contra *sox9* e inmunotinciones utilizando un anticuerpo anti-*Pdx1*. A las 48hpf, los embriones morfantes presentaban una marcada reducción de la expresión de *sox9b* en el dominio pancreático (Fig. r22a y b). Tras el análisis de las imágenes obtenidas al microscopio confocal (Fig. r22c-k), se realizó un recuento de los progenitores pancreáticos *sox9*⁺/*pdx1*⁺ y las diferencias entre grupos fueron analizadas mediante el test estadístico T-Student. Así, se pudo constatar que tanto los embriones morfantes como aquellos inyectados con el ARNm que codifica TEAD-EnR presentaban una reducción en el número de progenitores pancreáticos *sox9*⁺/*pdx1*⁺ (Fig. r22o). Dado que los progenitores pancreáticos *sox9*⁺/*pdx1*⁺ dan lugar a todos los tipos de células pancreáticas diferenciadas (Gu y cols., 2002), estos resultados sugieren que la reducción en el número de células pancreáticas diferenciadas es consecuencia de la existencia, a su vez, de un menor número de células MPCs pancreáticas.

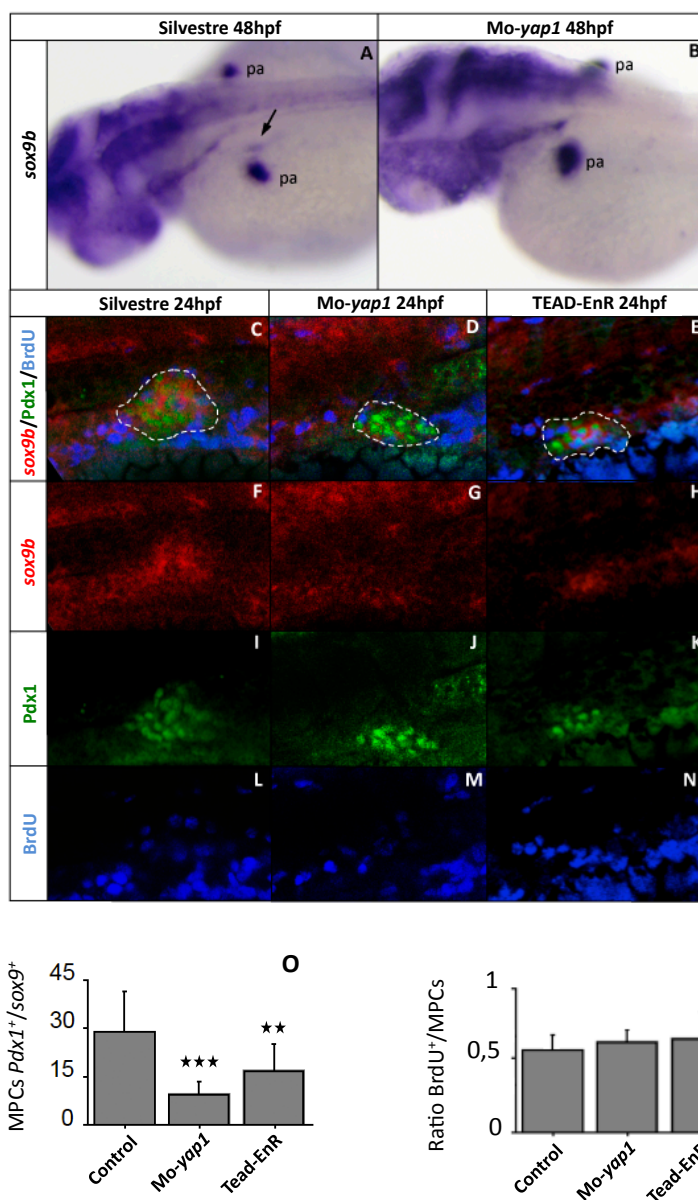


Fig. r22: Efectos de la manipulación de la vía Hippo sobre los progenitores pancreáticos. El panel superior muestra una vista dorso-lateral del patrón de expresión de *sox9b* en embriones de 48 hpf inyectados con *Mo-yap1* (B) en comparación con animales silvestres (A), donde se puede observar la ausencia del transcrito en el dominio pancreático (flecha). El panel central muestra el análisis al microscopio confocal del dominio pancreático (línea blanca punteada) de embriones de 24 hpf inyectados con *Mo-yap1* (D, G, J y M) y con TEAD-EnR (E, H, K y N) en comparación con embriones silvestres (C, F, I y L). Las células que expresan el transcrito de *sox9b* fueron puestas de manifiesto mediante hibridación *in situ* (citoplasma marcado en rojo), mientras que la presencia de Pdx1 fue detectada mediante inmunofluorescencia (núcleos marcados en verde). En azul, se muestran los núcleos de células proliferativas que incorporaron BrdU durante un período de tratamiento de 30 minutos y que fueron puestas de manifiesto mediante inmunofluorescencia. Las gráficas de la parte inferior muestran la disminución en el recuento de células progenitoras pancreáticas (MPC) tras la manipulación de la vía de señalización Hippo en comparación con los controles (O) y cómo no se encontraron diferencias significativas en la cantidad relativa de células en proceso de proliferación (expresada como número de células BrdU⁺ por cada célula progenitora MPC (P). (pa= primordio de la aleta; **= $P < 0,01$; ***= $P < 0,001$).

2.3.3 Tasa de proliferación.

Debido a que la vía de señalización Hippo, entre otras funciones, celulares es capaz de controlar la tasa de proliferación celular mediante la modulación de la expresión de genes efectores a través de la actividad del complejo YAP-TEAD (Udan y cols., 2003; Huang y cols., 2005), la existencia de un menor número de células progenitoras pancreáticas mitóticamente activas podría ser debido a que estas células presenten menor tasa de proliferación o bien tratarse de un problema en la especificación temprana del endodermo.

Para medir la tasa de proliferación celular, tanto embriones inyectados con *Mo-yap1* como embriones inyectados con el ARNm que codifica TEAD-EnR fueron sometidos a incorporación de BRDU durante un periodo de 30 minutos para más tarde ser teñidos usando un anticuerpo anti-BRDU. Tras el análisis de los embriones al microscopio confocal (Fig. r22l-n), se procedió al recuento de células que incorporaron BRDU. Estas células representan el conjunto de células mitóticamente activas durante el periodo de incubación con BRDU, al encontrarse en fase S del ciclo celular. Para trabajar con datos relativos al número de células progenitoras iniciales se calculó el ratio células BRDU⁺/células MPCs. Los embriones cuya actividad del complejo YAP-TEAD fue manipulada, presentaron un menor número de células MPCs pancreáticas BRDU⁺ pero no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el ratio células BRDU⁺/células MPCs (Fig. r22p), por lo que la reducción en el número de células en división se debe a la existencia, a su vez, de un menor número inicial de progenitores disponibles. Estos resultados sugieren que la reducción en el número de progenitores pancreáticos no es causada por una menor tasa de proliferación celular, por lo que podría estar causada por fallos en la especificación de los progenitores endodérmicos en fases tempranas del desarrollo.

Discusión

El control de la diferenciación y la proliferación es el resultado de la interacción entre programas de expresión génica y señales externas mediadas por factores de crecimiento, hormonas y por contactos directos entre células. La integración de estas señales tiene como resultado que una célula prolifere, se diferencie o sufra un proceso de muerte celular programada o apoptosis. Hasta la fecha, se han publicado numerosos trabajos que muestran el papel central de estos procesos biológicos y la actividad integrada de multitud de vías de señalización en el desarrollo embrionario. Esta tesis doctoral intenta arrojar luz sobre los efectos de la actividad de la vía de señalización del AR y la vía Hippo sobre el desarrollo de los arcos branquiales y el páncreas respectivamente. Para ello se han utilizado diferentes herramientas, desde técnicas clásicas como hibridación *in situ* o inmunohistoquímica, hasta técnicas de reciente aparición como el 4C, la transgénesis utilizando el novedoso vector ED o el uso de herramientas informáticas de análisis.

1. La vía de señalización del ácido retinoico en el desarrollo de los arcos branquiales.

El vector ED es una novedosa herramienta, capaz de detectar *enhancers*, y de discriminar su localización con respecto al punto de inserción en el genoma. Este vector permite también generar mutaciones regulatorias interfiriendo en la comunicación entre elementos reguladores y promotores, gracias al potente aislador que alberga en su secuencia (Bessa y cols., 2013). Además, el vector ED es una herramienta altamente eficiente, de sencilla utilización y de bajo coste, capaz de contribuir significativamente al estudio del papel de las secuencias no codificantes del ADN en la regulación de la expresión y función génica.

Durante la primera parte de esta tesis doctoral se generaron, mediante el uso del vector ED, un total de 223 líneas transgénicas estables y se documentaron sus patrones de expresión a 24 y 48 hpf, pudiendo haberse determinado el punto de inserción en el genoma para 59 de ellas. Los reporteros GFP y RFP presentes en el vector ED a ambos lados del aislador, son capaces de leer y utilizar la información regulatoria existente en las cercanías del punto de inserción, característica que nos ha permitido generar una colección de líneas transgénicas de *D. rerio* con expresión de fluorescencia específica de tejido que constituye un valioso recurso disponible para la comunidad científica (<http://www.upo.es/CABD/Edscreen>

/data.html). Para el desarrollo de esta tesis hemos hecho uso de esta capacidad de las líneas ED para realizar una búsqueda de nuevos genes candidatos a ser regulados por la vía de señalización del ácido retinoico.

Búsqueda de nuevos genes regulados por la vía de señalización del ácido retinoico.

La metodología de trabajo y el modelo animal elegidos para esta búsqueda resultan muy convenientes debido a que permiten analizar de manera indirecta la actividad transcripcional *in vivo* de un gen bajo diferentes condiciones experimentales, gracias a la emisión de fluorescencia y a que los embriones de pez cebra son transparentes y se desarrollan fuera de la madre. Además, este tipo de ensayos nos permite analizar cambios en los niveles de expresión génica en tejidos poco representados en el embrión, algo difícil de conseguir mediante otros métodos como la q-PCR. Por otra parte, esta metodología de búsqueda podría ser aplicada al análisis de otras vías de señalización y al descubrimiento de nuevos fármacos y tóxicos.

Si se consiguiera automatizar tanto la toma de imágenes como el análisis informático de los niveles de fluorescencia con la tecnología actualmente disponible, el volumen de líneas analizadas podría ser mucho mayor. Esta automatización también conllevaría poder analizar, por cada condición experimental, un número mucho mayor de embriones del que hemos sido capaces de procesar manualmente, por lo que al aumentar el tamaño de la muestra, también aumentaría la potencia estadística de nuestro ensayo y se podrían detectar cambios en la fluorescencia media que actualmente son interpretados como no significativos.

Tras los análisis visuales preliminares realizados a una selección de 33 líneas ED, decidimos centrar nuestra atención en la línea ED82, cuya inserción pudimos mapear en las cercanías del gen *fgf3*, y evaluar un poco más en profundidad su comportamiento ante las diferentes condiciones de cultivo.

Esta línea presentó cambios detectables en los niveles de fluorescencia de manera específica de tejido en el cerebro medio y en los arcos branquiales. Según muestran algunos estudios, la vía de señalización FGF y la del ácido retinoico están involucradas tanto en el desarrollo del cerebro como en el de las estructuras anatómicas derivadas de los arcos

branquiales (Glover y cols., 2006; Maden, 2007; Mark y cols., 2004; Crossley y cols., 1996; Cox y cols., 1995; Kengaku y cols., 1995; Colvin y cols., 1996; Muenke y cols., 1994; Jabs y cols., 1994), por lo que si se consiguiera confirmar mediante análisis complementarios la relación epistática observada entre estas dos vías de señalización, estas evidencias podrían sugerir un punto de encuentro entre ambas vías. En ese caso, podría ocurrir que la vía de señalización FGF estuviera siendo regulada por la del AR exclusivamente en el cerebro medio y los arcos branquiales, ya que no hemos conseguido detectar cambios en los niveles de fluorescencia en otros tejidos. Las pruebas obtenidas al respecto hasta el momento y el planteamiento de esta hipótesis de partida constituyen un buen punto de inicio para la realización de futuros estudios en profundidad.

Los niveles de expresión de mycb son modulados por la vía de señalización del ácido retinoico en los arcos branquiales.

Al igual que en el caso de la línea ED82, los resultados obtenidos para la línea ED97 también atrajeron nuestra atención y nos impulsaron a realizar experimentos adicionales. La línea ED97, cuya inserción fue asociada al gen *mycb* y con el que comparte gran parte de su patrón de expresión, también mostró una interesante respuesta específica de tejido al presentar una importante disminución en los niveles de GFP y un aumento de los mismos tras los tratamientos con AR y con DEAB respectivamente, de manera exclusiva en los arcos branquiales.

Tras el análisis del patrón de expresión de *mycb* bajo las diferentes condiciones experimentales, se pudo constatar que los niveles del transcrito de *mycb* muestra un comportamiento similar a los niveles del reportero. Esta observación, en primer lugar, viene a confirmar la validez de las mediciones de los niveles de GFP como método indirecto para detectar cambios en los niveles de expresión de los genes cercanos al punto de inserción en el genoma de las líneas ED. En segundo lugar, estas evidencias indican que la expresión de *mycb* en los arcos branquiales está bajo el control de la vía de señalización del AR.

Los datos recabados sugieren que esta vía controla negativamente a *mycb*, inhibiendo su expresión, ya que sus niveles disminuyen al sobreactivar la vía de señalización del AR. Teniendo esto en cuenta, podríamos suponer que el elemento o elementos reguladores

involucrados en este fenómeno son silenciadores que resultan activados por esta vía de señalización o *enhancers* que necesitan de bajos niveles de AR para dirigir la expresión de *mycb*. Los ensayos de proliferación celular realizados mostraron una posible reducción en la tasa de división celular en los arcos branquiales en embriones de 24hpf al someterlos a la exposición a altas dosis de AR, que debe ser explorada en más profundidad. La obtención de resultados robustos que confirmaran este extremo presentó la dificultad de que el área marcada con GFP en los arcos branquiales es de pequeñas dimensiones, conteniendo un número muy limitado de células, de las cuales muy pocas se encontraron dividiéndose a la vez en el momento en el que los embriones fueron fijados. En caso de confirmarse la reducción en la tasa de proliferación celular como respuesta a altos niveles de AR, aumentando el tamaño muestral, esta observación iría en concordancia con la importante implicación del protooncogén *mycb* en el control de la proliferación celular.

La conformación tridimensional de la cromatina es modificada como consecuencia de los cambios en los niveles de actividad de la vía del ácido retinoico.

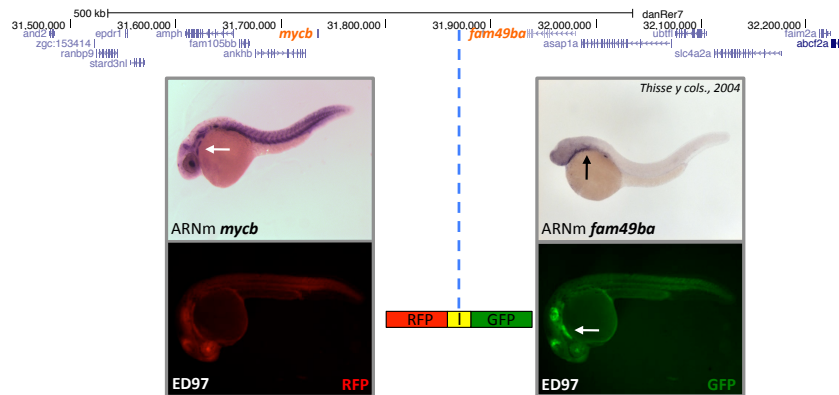
El análisis en conjunto de los resultados comentados hasta el momento en este trabajo sugiere que los niveles de expresión del gen *mycb* están bajo la influencia de los cambios en los niveles de AR disponible para las células de los arcos branquiales en el pez cebra. Esta modulación de los niveles del transcrito de *mycb* por parte de la vía de señalización del AR podría estar ocurriendo de manera directa o indirecta: podrían ser las proteínas receptoras del AR denominadas RAR y RXR las que actuaran directamente sobre el entorno regulatorio de *mycb*, uniéndose a sus secuencias diana en el genoma denominadas RARE (Retinoic Acid Responsive Elements) o bien podrían regular indirectamente los niveles de expresión de *mycb* en el caso de que fueran otros factores de transcripción, afectados por los cambios en los niveles de AR, los responsables de esta modulación.

Teniendo en cuenta la existencia de numerosos polimorfismos relacionados con enfermedades en humanos en esta región del genoma, se decidió analizar en más profundidad el entorno genómico de *mycb*. Para ello, se decidió utilizar la técnica 4C-seq (Circular Chromosome Conformation Capture with high-throughput Sequencing) que nos permite realizar una estimación de aquellas secuencias del genoma que están en contacto

directo con una secuencia de interés, como es en nuestro caso el promotor de *mycb*, entre las que teóricamente deberían encontrarse los elementos reguladores de este gen.

De la comparación de los perfiles de H3K27ac, H3K4me1 y 4C entre *myca* y *mycb* pueden extraerse dos conclusiones principales. En primer lugar, en ambos entornos genómicos existen *loci* con marcas de acetilación y monometilación coincidentes con picos de 4C, que

A



B

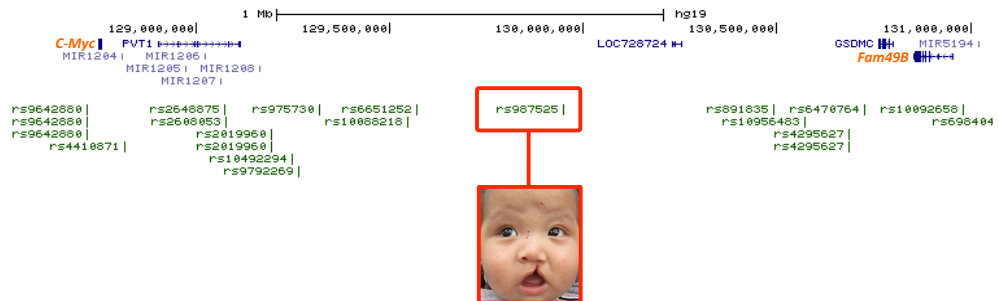


Fig. d1: Localización del vector ED en la línea ED97 y de polimorfismos relacionados con enfermedades humanas en el entorno de C-Myc. A: Patrones de expresión de GFP y RFP de la línea ED97, causados por la localización (línea discontinua azul) y orientación del vector ED. Éstos sugieren la presencia de uno o varios elementos reguladores capaces de dirigir la expresión de *mycb*, y posiblemente también de *fam49ba*, en los arcos branquiales (flechas), en algún lugar situado en dirección 5' desde el punto de inserción del aislador (I). B: Hasta el momento han sido identificados numerosos polimorfismos relacionados con enfermedades humanas en el entorno de *c-Myc* (verde), entre las que se incluye uno vinculado a la generación de paladar hendido y labio leporino (recuadro rojo).

presumiblemente se corresponden con elementos reguladores directamente relacionados con la modulación de la expresión de estos genes. En segundo lugar, se puede apreciar que los perfiles de H3K27ac, de H3K4me1 y de 4C son diferentes entre los dos genes, lo quiere decir que, aunque los dos genes son parálogos y procedentes de *C-Myc* tras la duplicación genómica ocurrida en teleósteos, sus entornos regulatorios tienen una diferente composición de elementos reguladores y un distinto patrón de contactos con sus respectivos promotores que podrían estar provocando las diferencias existentes entre los patrones de expresión de ambos genes.

Del mismo modo, del análisis del entorno regulatorio de *mycb* en el pez cebra y el de *C-Myc* en humanos, también se pueden extraer varias conclusiones interesantes. En primer lugar, *mycb* y *fam49ba* están en sintenia, encontrándose en la misma posición relativa en ambos genomas.

En segundo lugar, la inserción del vector ED en la línea ED97 está localizada en el desierto génico situado entre los genes *fam49ba* y *mycb*, habiendo sido asociada a éste último al presentar ED97 patrones de GFP y RFP que, en conjunto, recapitulan el patrón de expresión del ARNm de *mycb* (Fig. d1a). Además, tras el proceso de mapeo que se llevó a cabo para determinar el punto de inserción para esta línea, pudimos determinar que el vector ED se encuentra posicionado con el reportero GFP orientado hacia *fam49ba*. Debido a que esta línea presenta expresión de GFP específica en los arcos branquiales, donde la expresión de RFP parece estar ausente, y dada la capacidad del vector ED de discriminar entre información regulatoria situada a cada lado del aislador contenido en la inserción, podemos concluir que el elemento o elementos reguladores responsables de la expresión de *mycb* en los arcos branquiales deben encontrarse en algún lugar situado en dirección 5' desde el punto de inserción. Esta idea viene apoyada por el hecho de que *fam49ba* presenta, al igual que *mycb*, expresión específica en los arcos branquiales a las 24hpf (Fig. d1a).

En tercer lugar, numerosos estudios de asociación han identificado multitud de polimorfismos relacionados con enfermedades en este desierto génico, entre los que destaca uno (*rs987525*) asociado a la generación de paladar hendido y labio leporino (Ludwig y cols., 2012;), defectos derivados de fallos en el correcto desarrollo craneofacial (Fig. d1b).

Estos datos, tomados en conjunto, sugieren la presencia de elementos reguladores responsables de la expresión de *C-Myc* y *Fam49B* en los arcos branquiales, situados en el entorno genómico de estos dos genes, y su posible relación con la generación de malformaciones craneofaciales a consecuencia de un incorrecto desarrollo de las estructuras derivadas de los arcos branquiales.

Resulta importante señalar que los ensayos de 4C están realizados sobre la cromatina extraída a embriones completos, debido a la gran dificultad técnica que entrañaría diseccionar y aislar las células fluorescentes de los arcos branquiales, por lo que los efectos sobre el patrón de contactos del promotor de *mycb* que apreciamos tras los tratamientos llevados a cabo, representan la tendencia general para todas las células del embrión y no sólo la de las células de los arcos branquiales. Como ya se ha comentado anteriormente, las células que componen los arcos branquiales son muy poco numerosas en comparación con el resto de células del embrión, por lo que los perfiles de 4C que se muestran en este trabajo no representan necesariamente la configuración de la cromatina de las células que expresan *mycb* en los arcos branquiales. De hecho, ésta debería ser diferente ya que la respuesta de los niveles de *mycb* a los tratamientos es específica de tejido, pudiendo apreciarse cambios en la actividad transcripcional de este gen exclusivamente en los arcos branquiales. No obstante, estos ensayos muestran sin lugar a dudas que la conformación de la cromatina en el entorno genómico de *mycb* sufre importantes modificaciones tras la manipulación de la vía de señalización del ácido retinoico.

En un futuro, sería interesante realizar una comparación entre el perfil de 4C realizado a embriones silvestres y el perfil resultante de utilizar embriones de la línea ED97 con la inserción en homocigosis, para poder observar los efectos del aislador sobre la arquitectura de la cromatina alrededor del locus de *mycb*.

2. La vía de señalización Hippo en el desarrollo del páncreas.

El estudio realizado por nuestros colaboradores identificó los sitios de unión a lo largo del genoma de varios factores de transcripción esenciales para el desarrollo pancreático temprano. El análisis de la distribución de los sitios de unión mostró cómo éstos factores de transcripción se encuentran ocupando secuencias comunes, que funcionan como *enhancers*

específicos de células progenitoras pancreáticas multipotentes, siguiendo un código combinatorio de factores de transcripción específico para cada estadio del desarrollo. Así mismo, el trabajo llevado a cabo para esta tesis doctoral confirmó las observaciones de nuestros colaboradores, que sugieren que las proteínas TEAD son un componente principal de este código, y mostró como estas proteínas y su coactivador YAP se requieren durante el desarrollo pancreático temprano para activar genes reguladores esenciales para los progenitores pancreáticos multipotentes y controlar de esta manera el desarrollo de este órgano.

Sox9 es directamente regulado por la vía de señalización Hippo en progenitores pancreáticos.

La validación funcional de la actividad de la secuencia Sox9e1 mostró que ésta tiene capacidad de funcionar como *enhancer* y de dirigir la actividad transcripcional en el páncreas, de lo que se desprende que el elemento Sox9e1 presente en el genoma humano es capaz de mantener su funcionalidad al ser insertado en el genoma del pez cebra mediante la utilización de factores de transcripción que presumiblemente deben tener una función altamente conservada.

Por otro lado, la introducción de una mutación en el sitio de unión de TEAD1 presente en la secuencia de Sox9e1 provocó que ésta perdiera la capacidad de dirigir correctamente la expresión génica en el páncreas. Esta observación apoya la idea de que la proteína TEAD1 es necesaria para la correcta actuación de este elemento regulador de Sox9 y ratifica el papel central de las proteínas TEAD como componente del conjunto de factores de transcripción esenciales para el funcionamiento de los *enhancers* específicos de células MPCs pancreáticas. Estas evidencias implican directamente a la vía Hippo en la regulación de la expresión de Sox9 y por ende, en el desarrollo pancreático.

La vía de señalización Hippo controla programas transcripcionales de especificación celular durante el desarrollo pancreático.

Para examinar la función *in vivo* de las proteínas YAP y TEAD en el desarrollo pancreático, se llevaron a cabo experimentos de inhibición de la actividad de ambas proteínas mediante el uso de un morfolino contra *yap1* y de una forma modificada de la proteína TEAD1, fusionada con el dominio represor transcripcional de Engrailed, con actividad dominante

negativa. La manipulación de la actividad de ambas proteínas causó una reducción en el tamaño del páncreas en desarrollo existiendo una disminución en el número de todos los tipos celulares diferenciados analizados, lo que viene a confirmar que la vía Hippo está directamente involucrada en el desarrollo pancreático. Tras la realización de análisis complementarios, pudimos constatar que la reducción en el número de células diferenciadas es debida a una merma en el número de progenitores pancreáticos *Pdx1⁺/Sox9⁺*. De estas observaciones se desprende que el correcto funcionamiento de la vía de señalización Hippo es esencial para la generación de la cantidad apropiada de progenitores pancreáticos multipotentes que puedan posteriormente dar lugar al número correcto de cada tipo celular diferenciado. Los resultados arrojados por los ensayos de incorporación de BRDU realizados sugieren que para dar lugar al número apropiado de progenitores pancreáticos, la vía Hippo parece no regular la tasa de proliferación celular, que no hemos encontrado significativamente modificada tras la manipulación de la actividad de YAP y TEAD. En su lugar, la vía Hippo parece estar involucrada en el proceso de especificación del número correcto de progenitores pancreáticos, posiblemente mediante el control de la expresión, entre otros, de *Sox9*.

Los datos recabados por nuestros colaboradores muestran cómo a medida que los progenitores pancreáticos multipotentes comienzan el proceso de diferenciación hacia los linajes endocrino o acinar, la expresión de *Yap* es inhibida y la proteína inmediatamente retirada del núcleo. Presumiblemente, este mecanismo permite la supresión de la actividad de los *enhancers* con actividad específica en células progenitoras pancreáticas durante el proceso de diferenciación celular. Los experimentos llevados a cabo en nuestro laboratorio, por su parte, confirman la implicación de *Sox9* y de la vía de señalización Hippo en el desarrollo pancreático. Nuestros resultados muestran que *Sox9* es regulado por un *enhancer* que presenta un sitio de unión a TEAD, lo que le permite responder a la modulación por parte la vía Hippo, y evidencian el rol de esta vía en la especificación de los progenitores pancreáticos.

A pesar de que nuestros estudios son los primeros en identificar una función asociada a componentes de la vía de señalización Hippo en el desarrollo pancreático, dos recientes publicaciones muestran que la interferencia con la actividad de las kinasas Mst1 y Mst2 conduce a un incremento en la proliferación de las células acinares en el páncreas adulto, que adquieren una morfología de célula ductal mostrando un incremento en la localización

nuclear de YAP y la expresión ectópica del gen diana de TEAD, *Sox9* (Gao y cols., 2013; George y cols., 2012).

De manera colectiva, los datos existentes sugieren un modelo en el que las proteínas YAP y TEAD funcionan como interruptores que activan programas transcripcionales específicos en las células progenitoras pancreáticas multipotentes y posibilitan la inactivación de estos programas en respuesta a señales externas durante la diferenciación de las células pancreáticas.

Conclusiones

1. La colección de líneas transgénicas ED de pez cebra y la metodología utilizada en este trabajo, son excelentes herramientas para examinar la pertenencia de genes a determinadas vías de señalización y, presumiblemente, para el descubrimiento de nuevos fármacos y tóxicos.
2. Varias líneas ED muestran variaciones en los niveles de expresión del reportero GFP tras la manipulación de los niveles de actividad de la vía de señalización del AR, de manera específica de tejido.
3. Los niveles de expresión de GFP de línea ED82, asociada al gen *fgf3*, muestran una respuesta específica en los arcos branquiales y el cerebro tras la manipulación de la vía de señalización del AR, lo que podría sugerir un punto de encuentro entre esta vía de señalización y la vía FGF.
4. Los niveles de expresión de GFP de la línea ED97, asociada al gen *mycb*, muestran una respuesta específica en los arcos branquiales tras la manipulación de la vía de señalización del AR.
5. La vía de señalización del AR es capaz de controlar los niveles de expresión del gen *mycb* específicamente en los arcos branquiales.
6. En los entornos genómicos de *mycb* y de *myca* existen regiones con marcas de H3K37ac y H3K4me1 coincidentes con picos de 4C, que presumiblemente se corresponden con elementos reguladores directamente relacionados con la modulación de la expresión de estos genes.
7. Los perfiles de H3K37ac, H3K4me1 y 4C son diferentes entre *mycb* y *myca*, lo que sugiere que sus entornos genómicos tienen una diferente composición de elementos reguladores y un distinto patrón de contactos con sus respectivos promotores, que podrían estar provocando las diferencias existentes entre los patrones de expresión de ambos genes.
8. El elemento o elementos reguladores responsables de la expresión de *mycb* en los arcos branquiales del pez cebra deben encontrarse en algún lugar situado en dirección 5' desde el punto de inserción del vector ED en la línea ED97.

9. La conformación de la cromatina en el entorno genómico de *mycb* sufre importantes modificaciones tras la manipulación de la vía de señalización del AR.
10. El elemento regulador Sox9e1, procedente de humanos, es capaz de dirigir expresión génica en el páncreas del pez cebra mediante la utilización de factores de transcripción que presumiblemente deben tener una función altamente conservada.
11. Sox9 es directamente regulado por la vía de señalización Hippo en progenitores pancreáticos a través del enhancer Sox9e1, cuya actividad depende de la correcta unión de TEAD1.
12. La vía de señalización Hippo controla el desarrollo pancreático mediante la regulación de la actividad de las proteínas YAP y TEAD.
13. Las proteínas YAP y TEAD funcionan como interruptores para la activación de programas transcripcionales de especificación celular durante el desarrollo pancreático.

Anexo

Nombre	Secuencia
3ToIF1	5'-TTTACTCAAGTAAGATTCTAG-3'
3ToIR1	5'-CTCCATTAAATTTGACTTG-3'
3ToIF2	5'-ACTTGACTTTCACTTGAGTA-3'
3ToIR2	5'-GCAAGAAAGAAAAGTAGAGA-3'
3ToITest	5'-GATATCCATGGAATTCAGTAGTGC-3'
5ToIF1	5'-CTTGAGTACAATTAATAATCAATAC-3'
5ToIR1	5'-GTAAAAATCCCCAAAAATAATAC-3'
5ToIF2	5'-CTCCTTACAATTTTATTACAGTC-3'
5ToIR2	5'-GTAAAATTACTCAAGTACTTTACACC-3'
GW1	5'-GTTGCAACAAATTGATGAGCAATGC-3'
Yap1_Rv	5'-TGCGAACCTTGCTTTACTGG-3'
Yap1_Fw	5'-TGCCAGACTCATTCTTCACG-3'
Mo-Yap1	5'-AGCAACATTAACAACCTCACTTTAGG-3'
Sonda_Mycb_Fw	5'-CATGCCGCTGAATTCAAGTATGG-3'
Sonda_Mycb_Rv	5'-ATTAAGTCCAGGCAGCTTAAGAACAGC-3'
4C_mycb_Fw	5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGTAAATTAGAATAAGC TGGCAGTA-3'
4C_mycb_Rv	5'-AATGATACGGCGACCACCGAACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCG ATCTTATTAGAGTGTTTGATAGCTGATC-3'
4C_myca_Fw	5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGAACTCTTGCTCTTGAGGAATGAAGTGC-3'
4C_myca_Rv	5'-AATGATA CGGCGACCACCGAACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTAGTGAGCTGTCAGTCTTGATC-3'

Tabla suplementaria 2: Cebadores utilizados.

Bibliografía

- Acevedo ML, Kraus WL (2004). Transcriptional activation by nuclear receptors. *Essays Biochem* **40**:73-88.
- Adamson ED (1993). Growth factors and their receptors in development. *Dev Genet.* **14**:159-164.
- Ahlgren U, Jonsson J, Jonsson L, Simu K, Edlund H (1998). beta-cell-specific inactivation of the mouse *Ip1/Pdx1* gene results in loss of the beta-cell phenotype and maturity onset diabetes. *Genes Dev.* **12**:1763-1768.
- Apelqvist A, Ahlgren U, Edlund H (1997). Sonic hedgehog directs specialised mesoderm differentiation in the intestine and pancreas. *Curr Biol.* **7**:801-804.
- Apelqvist A, Li H, Sommer L, Beatus P, Anderson DJ, Honjo T, et al. (1999). Notch signalling controls pancreatic cell differentiation. *Nature* **400**:877-881.
- Argenton F, Zecchin E, Bortolussi M (1999). Early appearance of pancreatic hormone-expressing cells in the zebrafish embryo. *Mech Dev.* **87**:217-221.
- Avantaggiato V, Acampora D, Tuorto F, Simeone A (1996). Retinoic acid induces stage-specific repatterning of the rostral central nervous system. *Dev Biol.* **175**(2):347-57.
- Balmer JE, Blomhoff R (2002). Gene expression regulation by retinoic acid. *J Lipid Res.* **43**(11):1773-1808.
- Bannister AJ y Kouzarides T (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* **21**: 381–395.
- Begemann G, Marx M, Mebus K, Meyer A, Bastmeyer M (2004). Beyond the neckless phenotype: influence of reduced retinoic acid signaling on motor neuron development in the zebrafish hindbrain. *Dev Biol.* **271**:119-129.
- Bell AC, West AG, Felsenfeld G (2001). Insulators and boundaries: versatile regulatory elements in the eukaryotic genome. *Science* **291**:447-450.
- Beres TM, Masui T, Swift GH, Shi L, Henke RM, MacDonald RJ (2006). PTF1 is an organ-specific and Notch-independent basic helix-loop-helix complex containing the mammalian Suppressor of Hairless (RBP-J) or its paralogue, RBP-L. *Mol Cell Biol.* **26**:117-130.
- Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J, Fry B, Meissner A, Wernig M, Plath K, Jaenisch R, Wagschal A, Feil R, Schreiber SL, Lander ES (2006) A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* **125**(2): 315-26.
- Bessa J, Luengo M, Rivero-Gil S, Ariza-Cosano A, Maia AH, Ruiz-Ruano FJ, Caballero P, Naranjo S, Carvajal JJ, Gomez-Skarmeta JL (2013). A mobile insulator system to detect and disrupt cis-regulatory landscapes in vertebrates. *Genome Res.* (Epub ahead of print)

- Bessa J, Tena JJ, de la Calle-Mustienes E, Fernández-Miñán A, Naranjo S, Fernández A, Montoliu L, Akalin A, Lenhard B, Casares F, Gómez-Skarmeta JL (2009). Zebrafish enhancer detection (ZED) vector: a new tool to facilitate transgenesis and the functional analysis of cis-regulatory regions in zebrafish. *Dev Dyn.* **238**(9):2409-2417.
- Biemar F, Argenton F, Schmidtke R, Epperlein S, Peers B, Driever W (2001). Pancreas development in zebrafish: early dispersed appearance of endocrine hormone expressing cells and their convergence to form the definitive islet. *Dev Biol.* **230**:189-203.
- Bishop JM (1982). Retroviruses and cancer genes. *Adv Cancer Res.* **37**:1-32.
- Bister K y. Jansen HW (1986). Oncogenes in retroviruses and cells: biochemistry and molecular genetics. *Adv Cancer Res.* **47**:99-188.
- Blow MJ, McCulley DJ, Li Z, Zhang T, Akiyama JA, Holt A, Plajzer-Frick I, Shoukry M, Wright C, Chen F, Afzal V, Bristow J, Ren B, Black BL, Rubin EM, Visel A, Pennacchio LA (2010). ChIP-Seq identification of weakly conserved heart enhancers. *Nat Genet.* **42**: 806–810.
- Blow MJ, McCulley DJ, Li Z, Zhang T, Akiyama JA, Holt A, Plajzer-Frick I, Shoukry M, Wright C, Chen F, et al. (2010). ChIP-Seq identification of weakly conserved heart enhancers. *Nat Genet.* **42**:806-810.
- Bogdanović O, Fernandez-Miñán A, Tena JJ, de la Calle-Mustienes E, Hidalgo C, van Kruysbergen I, van Heeringen SJ, Veenstra GJ, Gómez-Skarmeta JL (2012). Dynamics of enhancer chromatin signatures mark the transition from pluripotency to cell specification during embryogenesis. *Genome Res.* **22**(10):2043-53.
- Bogdanović O, Fernández-Miñán A, Tena JJ, de la Calle-Mustienes E, Gómez-Skarmeta JL: The developmental epigenomics toolbox (2013). ChIP-seq and MethylCap-seq profiling of early zebrafish embryos. *Methods.* **62**:207-215.
- Bonn S, Zinzen RP, Girardot C, Gustafson EH, Perez-Gonzalez A, Delhomme N, Ghavi-Helm Y, Wilczynski B, Riddell A, Furlong EE (2012). Tissue specific analysis of chromatin state identifies temporal signatures of enhancer activity during embryonic development. *Nat Genet.* **44**:148-156.
- Bradford Y, Conlin T, Dunn N, Fashena D, Frazer K, Howe DG, Knight J, Mani P, Martin R, Moxon SAT, et al. (2011). ZFIN: enhancements and updates to the Zebrafish Model Organism Database. *Nucleic Acids Res* **39**: D822-829.
- Brand AH, Breeden L, Abraham J, Sternglanz R, Nasmyth K (1985). Characterization of a "silencer" in yeast: a DNA sequence with properties opposite to those of a transcriptional enhancer. *Cell* **41**:41-48.
- Burke Z, Oliver G (2002). Prox1 is an early specific marker for the developing liver and pancreas in the mammalian foregut endoderm. *Mech Dev.* **118**:147-155.

- Burlison JS, Long Q, Fujitani Y, Wright CV, Magnuson MA (2008). Pdx-1 and Ptf1a concurrently determine fate specification of pancreatic multipotent progenitor cells. *Dev Biol.* **316**:74-86.
- Buxton RS, Magee AI (1992). Structure and interactions of desmosomal and other cadherins. *Semin Cell Bio.* **3**:157-167.
- Carrasco M, Delgado I, Soria B, Martin F, Rojas A (2012). GATA4 and GATA6 control mouse pancreas organogenesis. *J Clin Invest.* **122**:3504-3515.
- Chakrabarti SK, James JC, Mirmira RG (2002). Quantitative assessment of gene targeting in vitro and in vivo by the pancreatic transcription factor, Pdx1. Importance of chromatin structure in directing promoter binding. *J Biol Chem.* **277**:13286-13293.
- Chen Y, Pan FC, Brandes N, Afelik S, Solter M, Pieler T (2004). Retinoic acid signaling is essential for pancreas development and promotes endocrine at the expense of exocrine cell differentiation in Xenopus. *Dev Biol.* **271**:144-160.
- Chung JH, Whiteley M, Felsenfeld G (1993). A 5' element of the chicken beta-globin domain serves as an insulator in human erythroid cells and protects against position effect in Drosophila. *Cell* **74**: 505–514.
- Chung JH, Whiteley M, Felsenfeld G (1993). A 5' element of the chicken beta-globin domain serves as an insulator in human erythroid cells and protects against position effect in Drosophila. *Cell* **74**:505-514.
- Chung WS, Shin CH, Stainier DY (2008). Bmp2 signaling regulates the hepatic versus pancreatic fate decision. *Dev Cell.* **15**:738-748.
- Chung WS, Stainier DY (2008). Intra-endodermal interactions are required for pancreatic beta cell induction. *Dev Cell.* **14**:582-593.
- Cockell M, Stevenson BJ, Strubin M, Hagenbuchle O, Wellauer PK (1989). Identification of a cell-specific DNA-binding activity that interacts with a transcriptional activator of genes expressed in the acinar pancreas. *Mol Cell Biol.* **9**:2464-2476.
- Cole MD (1986).The myc oncogene: its role in transformation and differentiation. *Annu Rev Genet.* **20**:361–384.
- Collette NM, Genetos DC, Economides AN, Xie L, Shahnazari M, Yao W, Lane NE, Harland RM, Loots GG (2012). Targeted deletion of Sost distal enhancer increases bone formation and bone mass. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**:14092-14097.
- Colvin SJ, Bohne BA, Harding GW, McEwen DG, Ornitz DM (1996). Skeletal overgrowth and deafness in mice lacking fibroblast growth factor receptor 3. *Nature Gen.* **12**:390-397.
- Cox WG, Hemmati-Brivanlou A (1995). Caudalization of neural fate by tissue recombination and bFGF. *Development* **121**:4349-4358.
- Creyghton MP, Cheng AW, Welstead GG, Kooistra T, Carey BW, Steine EJ, Hanna J, Lodato MA, Frampton GM, Sharp PA, Boyer LA, Young RA, Jaenisch R (2010). Histone

- H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 21931–21936.
- Creyghton MP, Cheng AW, Welstead GG, Kooistra T, Carey BW, Steine EJ, Hanna J, Lodato MA, Frampton GM, Sharp PA, et al. (2010). Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**:21931-21936.
- Crossley PH, Martinez S, Martin GR (1996). Midbrain development induced by FGF8 in the chick embryo. *Nature* **380**:66-68.
- D'amico-Martel A, Noden DM (1983). Contributions of placodal and neural crest cells to avian cranial peripheral ganglia. *American Journal of Anatomy* **166**: 445-468.
- Dalla-Favera R, Bregni M, Erikson J, Patterson D, Gallo RC, Croce CM (1982). Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**(24):7824-7827.
- Dalla-Favera R, Gelmann EP, Martinotti S, Franchini G, Papas TS, Gallo RC y Wong-Staal F (1982). Cloning and characterization of different human sequences related to the onc gene (v-myc) of avian myelocytomatosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**(21):6497-6501.
- Dang CV (1999). c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol Cell Biol.* **19**(1):1-11.
- Dang CV (1999). c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol Cell Biol.* **19**: 1–11.
- Dang CV, Dolde C, Gillison ML y Kato GJ (1992). Discrimination between related DNA sites by a single amino acid residue of Myc-related basic-helix-loop-helix proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**:599–602.
- Dang CV, O'Donnell KA, Zeller KI, Nguyen T, Osthus RC, Li F (2006). The c-Myc target gene network. *Semin Cancer Biol.* **16**(4):253-264.
- De la Calle-Mustienes E, Feijoo CG, Manzanares M, Tena JJ, Rodríguez-Seguel E, Letizia A, Allende ML, Gomez-Skarmeta JL (2005). A functional survey of the enhancer activity of conserved non-coding sequences from vertebrate Iroquois cluster gene deserts. *Genome Res.* **15**:1061-1072.
- de Laat W, Duboule D (2013). Topology of mammalian developmental enhancers and their regulatory landscapes. *Nature.* **502**(7472):499-506.
- Dekker J, Rippe K, Dekker M, Kleckner N (2002). Capturing chromosome Conformation. *Science* **295**(5558):1306-1311.
- Deutsch G, Jung J, Zheng M, Lora J, Zaret KS (2001). A bipotential precursor population for pancreas and liver within the embryonic endoderm. *Development* **128**:871-881.
- Devos N, Deflorian G, Biemar F, Bortolussi M, Martial JA, Peers B, Argenton F (2002). Differential expression of two somatostatin genes during zebrafish embryonic development. *Mech Dev.* **115**:133-137.

- Dilorio P, Alexa K, Choe SK, Etheridge L, Sagerstrom CG (2007). TALE-family homeodomain proteins regulate endodermal sonic hedgehog expression and pattern the anterior endoderm. *Dev Biol.* **304**:221-231.
- Dixon JR, Selvaraj S, Yue F, Kim A, Li Y, Shen Y, Hu M, Liu JS, Ren B (2012). Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature* 485:376-380.
- Dong J, Feldmann G, Huang J, Wu S, Zhang N, Comerford SA, et al. (2007). Elucidation of a universal size-control mechanism in *Drosophila* and mammals. *Cell* **130**:1120-1133.
- Dong PD, Provost E, Leach SD, Stainier DY (2008). Graded levels of Ptf1a differentially regulate endocrine and exocrine fates in the developing pancreas. *Genes Dev.* **22**:1445-1450.
- Dong PD, Provost E, Leach SD, Stainier DY (2008). Graded levels of Ptf1a differentially regulate endocrine and exocrine fates in the developing pancreas. *Genes Dev.* **22**:1445-1450.
- Dong, QP, Blatter EE, Ebright YW, Bister K y Ebright RH (1994). Identification of amino acid base contacts in the myc DNA complex by site-specific bromouracil mediated photocrosslinking. *EMBO J.* **13**:200–204.
- Durston AJ, Timmermans JP, Hage WJ, Hendriks HF, de Vries NJ, Heideveld M, Nieuwkoop PD (1989). Retinoic acid causes an anteroposterior transformation in the developing central nervous system. *Nature* **340**(6229):140-144.
- Dutta S, Bonner-Weir S, Montminy M, Wright C (1998). Regulatory factor linked to late-onset diabetes? *Nature* **392**:560.
- Eilers M, Eisenman RN (2008). Myc's broad reach. *Genes Dev.* **22**(20):2755-2766.
- Esni F, Ghosh B, Biankin AV, Lin JW, Albert MA, Yu X, MacDonald RJ, Civin CI, Real FX, Pack MA, Ball DW, Leach SD (2004). Notch inhibits Ptf1 function and acinar cell differentiation in developing mouse and zebrafish pancreas. *Development* **131**:4213-4224.
- Evan GI, Wyllie AH, Gilbert CS, Littlewood TD, Land H, Brooks M, Waters CM, Penn LZ, Hancock DC (1992). Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* **69**:119-128.
- Facchini LM y Penn LZ (1998). The molecular role of Myc in growth and transformation: recent discoveries lead to new insights. *FASEB J.* **12**:633-651.
- Fang H, Jin W, Yang Y, Jin Y, Zhang J, Wang K (2011). An organogenesis network-based comparative transcriptome analysis for understanding early human development in vivo and in vitro. *BMC Syst Biol.* **5**:108.
- Fang H, Yang Y, Li C, Fu S, Yang Z, Jin G, Wang K, Zhang J, Jin Y (2010). Transcriptome analysis of early organogenesis in human embryos. *Dev Cell.* **19**(1):174-84.

- Ferre-D'Amare AR, Pognonec P, Roeder RG y Burley SK (1994). Structure and function of the b/HLH/Z domain of USF. *EMBO J.* **13**:180–189.
- Field HA, Dong PD, Beis D, Stainier DY (2003). Formation of the digestive system in zebrafish. II. Pancreas morphogenesis. *Dev Biol.* **261**:197-208.
- Frogne T, Sylvestersen KB, Kubicek S, Nielsen ML, Hecksher-Sørensen J (2012). Pdx1 is post-translationally modified in vivo and serine 61 is the principal site of phosphorylation. *PLoS ONE* **7**(4): e35233.
- Fukuda A, Kawaguchi Y, Furuyama K, Kodama S, Horiguchi M, Kuhara T, Kawaguchi M, Terao M, Doi R, Wright CV, et al. (2008). Reduction of Ptf1a gene dosage causes pancreatic hypoplasia and diabetes in mice. *Diabetes.* **57**:2421-2431.
- Gale E, Zile M, Maden M (1999). Hindbrain respecification in the retinoid-deficient quail. *Mech Dev.* **89**(1-2):43-54.
- Gallego I, Ruvinsky I, Gilad Y (2012). Comparative studies of gene expression and the evolution of gene regulation *Nature Reviews Genetics* **13**, 505-516.
- Gannon M, Tweedie Ables E, Crawford L, Lowe D, Offield MF, Magnuson MA, Wright CV (2008). pdx-1 function is specifically required in embryonic beta cells to generate appropriate numbers of endocrine cell types and maintain glucose homeostasis. *Dev Biol.* **314**:406-417.
- Gao N, LeLay J, Vatamaniuk MZ, Rieck S, Friedman JR, Kaestner KH (2008). Dynamic regulation of Pdx1 enhancers by Foxa1 and Foxa2 is essential for pancreas development. *Genes Dev.* **22**(24):3435-3448.
- Gao T, Zhou D, Yang C, Singh T, Penzo-Méndez A, Maddipati R, Tzatsos A, Bardeesy N, Avruch J, Stanger BZ (2013). Hippo signaling regulates differentiation and maintenance in the exocrine pancreas. *Gastroenterology*.**144**(7):1543-53
- George NM, Day CE, Boerner BP, Johnson RL, Sarvetnick NE (2012). Hippo signaling regulates pancreas development through inactivation of Yap. *Mol Cell Biol.* **32**(24):5116-28.
- Geyer PK, Corces VG (1992). DNA position-specific repression of transcription by a Drosophila zinc finger protein. *Genes Dev.* **6**:1865-1873.
- Ghiasvand NM, Rudolph DD, Mashayekhi M, Brzezinski JA 4th, Goldman D, Glaser T (2011). Deletion of a remote enhancer near ATOH7 disrupts retinal neurogenesis, causing NCRNA disease. *Nat Neurosci.* **14**:578-586.
- Giraldo P, Martínez A, Regales L, Lavado A, García-Díaz A, Alonso A, Busturia A, Montoliu L. (2003). Functional dissection of the mouse tyrosinase locus control region identifies a new putative boundary activity. *Nucleic Acids Res.* **31**:6290-6305.
- Gittes GK, Rutter WJ (1992). Onset of cell-specific gene expression in the developing mouse pancreas. *Proc Natl Aca Sci USA* **89**:1128-1132.

- Glass CK, Rosenfeld MG (2000). The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev.* **14**:121-141.
- Glover JC, Renaud JS, Rijli FM (2006). Retinoic acid and hindbrain patterning. *J. Neurobiol.* **66**:705–725.
- Goessling W, North TE, Lord AM, Ceol C, Lee S, Weidinger G, Bourque C, Strijbosch R, Haramis AP, Puder M, Clevers H, Moon RT, Zon LI (2008). APC mutant zebrafish uncover a changing temporal requirement for wnt signaling in liver development. *Dev Biol.* **320**: 161-174.
- Goulev Y, Fauny JD, Gonzalez-Marti B, Flagiello D, Silber J, Zider A (2008). SCALLOPED interacts with YORKIE, the nuclear effector of the Hippo tumor-suppressor pathway in Drosophila. *Curr Biol.* **18**:435-441.
- Gradwohl G, Dierich A, LeMeur M, Guillemot F (2000). neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**:1607-1611.
- Graham A (2001). The development and evolution of the pharyngeal arches. *J Anat.* **199** (Pt 1-2):133-141.
- Gu G, Dubauskaite J, Melton DA (2002). Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development* **129**:2447-2457.
- Gu G, Dubauskaite J, Melton DA (2002). Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development* **129**(10):2447-2457.
- Guz Y, Montminy MR, Stein R, Leonard J, Gamer LW, Wright CV, Teitelman G (1995). Expression of murine STF-1, a putative insulin gene transcription factor, in beta cells of pancreas, duodenal epithelium and pancreatic exocrine and endocrine progenitors during ontogeny. *Development* **121**:11-8.
- Hagege H, Klous P, Braem C, Splinter E, Dekker J, Cathala, G, de Laat W, Forne T (2007). Quantitative analysis of chromosome conformation capture assays (3C-qPCR). *Nat Protoc.* **2**(7):1722-1733.
- Hald J, Sprinkel AE, Ray M, Serup P, Wright C, Madsen OD (2008). Generation and characterization of Ptf1a antiserum and localization of Ptf1a in relation to Nkx6.1 and Pdx1 during the earliest stages of mouse pancreas development. *J Histochem Cytochem* **56**:587-595.
- Halder G and Johnson R, (2011). Hippo signaling: growth control and beyond. *Development* **138**:9-22.
- Hamaratoglu F, Willecke M, Kango-Singh M, Nolo R, Hyun E, Tao C, Jafar-Nejad H, Halder G (2006). The tumour-suppressor, genes NF2/Merlin and Expanded act through Hippo signalling to regulate cell proliferation and apoptosis. *Nat Cell Biol.* **8**:27-36.

- Han K, Manley JL (1993). Functional domains of the Drosophila Engrailed protein. *EMBO J.* **12**(7):2723-33.
- Harland RM (1991). In situ hybridization: an improved whole-mount method for Xenopus embryos. *Methods Cell Biol.* **36**: 685-695.
- Haumaitre C, Barbacci E, Jenny M, Ott MO, Gradwohl G, Cereghini S (2005). Lack of TCF2/vHNF1 in mice leads to pancreas agenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**:1490-1495.
- Haumaitre C, Barbacci E, Jenny M, Ott MO, Gradwohl G, Cereghini S (2005). Lack of TCF2/vHNF1 in mice leads to pancreas agenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**(5):1490-1495.
- Hawkins RD, Hon GC, Yang C, Antosiewicz-Bourget JE, Lee LK, Ngo QM, Klugman S, Ching KA, Edsall LE, Ye Z, et al. (2011). Dynamic chromatin states in human ES cells reveal potential regulatory sequences and genes involved in pluripotency. *Cell Res.* **21**:1393-1409.
- Hebrok M, Kim SK, Melton DA (1998). Notochord repression of endodermal Sonic hedgehog permits pancreas development. *Genes Dev.* **12**:1705-1713.
- Heintzman ND, Hon GC, Hawkins RD, Kheradpour P, Stark A, Harp LF, Ye Z, Lee LK, Stuart RK, Ching CW, Ching KA, Antosiewicz-Bourget JE, Liu H, Zhang X, Green RD, Lobanenko VV, Stewart R, Thomson JA, Crawford GE, Kellis M, Ren B (2009). Histone modifications at human enhancers reflect global cell-type-specific gene expression. *Nature* **459**:108-112.
- Heintzman ND, Hon GC, Hawkins RD, Kheradpour P, Stark A, Harp LF, Ye Z, Lee LK, Stuart RK, Ching CW, Ching KA, Antosiewicz-Bourget JE, Liu H, Zhang X, Green RD, Lobanenko VV, Stewart R, Thomson JA, Crawford GE, Kellis M, Ren B (2009). Histone modifications at human enhancers reflect global cell-type-specific gene expression. *Nature* **459**(7243):108-112.
- Heintzman ND, Stuart RK, Hon G, Fu Y, Ching CW, Hawkins RD, Barrera LO, Van Calcar S, Qu C, Ching KA, et al. (2007). Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome'. *Nat Genet.* **39**(3):311-8.
- Heinz S, Benner C, Spann N, Bertolino E, Lin YC, Laslo P, Cheng JX, Murre C, Singh H, Glass CK (2010). Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-regulatory elements required for macrophage and B cell identities. *Mol Cell.* **38**(4):576-589.
- Heller RS, Jenny M, Collombat P, Mansouri A, Tomasetto C, Madsen OD, Mellitzer G, Gradwohl G, Serup P (2005). Genetic determinants of pancreatic epsilon-cell development. *Dev Biol.* **286**:217-224.
- Heller RS, Stoffers DA, Liu A, Schedl A, Crenshaw EB 3rd, Madsen OD, Serup P (2004). The role of Brn4/ Pou3f4 and Pax6 in forming the pancreatic glucagon cell identity. *Dev Biol.* **268**:123-134.

- Henriksson M y Luscher B (1996). Proteins of the Myc network: essential regulators of cell growth and differentiation. *Adv Cancer Res.* **68**:109-182.
- Henseleit KD, Nelson SB, Kuhlbrodt K, Hennings JC, Ericson J, Sander M (2005). NKX6 transcription factor activity is required for alpha- and beta-cell development in the pancreas. *Development* **132**:3139-3149.
- Herrera PL (2000). Adult insulin- and glucagon-producing cells differentiate from two independent cell lineages. *Development* **127**:2317-2322.
- Herrera PL, Huarte J, Sanvito F, Meda P, Orci L, Vassalli JD (1991). Embryogenesis of the murine endocrine pancreas; early expression of pancreatic polypeptide gene. *Development* **113**: 1257-1265.
- Herrera PL, Huarte J, Zufferey R, Nichols A, Mermillod B, Philippe J, Muniesa P, Sanvito F, Orci L, Vassalli JD (1994). Ablation of islet endocrine cells by targeted expression of hormone-promoter-driven toxigenes. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**:12999-13003.
- Hong JH, Hwang ES, McManus MT, Amsterdam A, Tian Y, Kalmukova R, et al. (2005). TAZ, a transcriptional modulator of mesenchymal stem cell differentiation. *Science* **309**:1074-1078.
- Huang J, Wu S, Barrera J, Matthews K, Pan D (2005). The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the Drosophila homolog of YAP. *Cell* **122**:421-434.
- Huang J, Wu S, Barrera J, Matthews K, Pan D (2005). The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the Drosophila Homolog of YAP. *Cell* **122**(3):421-434.
- Jabs EW, Li X, Scott AF, Meyers G, Chen W, Eccles M, Mao JJ, Charnas LR, Jackson CE, Jaye M (1994). Jackson-Weiss and Crouzon syndromes are allelic with mutations in fibroblast growth factor receptor 2. *Nature Genet.* **8**:275-279.
- Jacquemin P, Durviaux SM, Jensen J, Godfraind C, Gradwohl G, Guillemot F, Madsen OD, Carmeliet P, Dewerchin M, Collen D, Rousseau GG, Lemaigre FP (2000). Transcription factor hepatocyte nuclear factor 6 regulates pancreatic endocrine cell differentiation and controls expression of the proendocrine gene ngn3. *Mol Cell Biol.* **20**(12):4445-4454.
- Jacquemin P, Yoshitomi H, Kashima Y, Rousseau GG, Lemaigre FP, Zaret KS (2006). An endothelialmesenchymal relay pathway regulates early phases of pancreas development. *Dev Biol.* **290**:189-199.
- Jensen J, Heller RS, Funder-Nielsen T, Pedersen EE, Lindsell C, Weinmaster G, Madsen OD, Serup P (2000). Independent development of pancreatic alpha- and beta-cells from neurogenin3-expressing precursors: a role for the notch pathway in repression of premature differentiation. *Diabetes.* **49**:163-176.
- Jensen J, Heller RS, Funder-Nielsen T, Pedersen EE, Lindsell C, Weinmaster G, Madsen OD, Serup P (2000). Independent development of pancreatic alpha- and beta-cells from

- neurogenin3-expressing precursors: a role for the notch pathway in repression of premature differentiation. *Diabetes*. **49**:163-176.
- Jensen J, Pedersen EE, Galante P, Hald J, Heller RS, Ishibashi M, Kageyama R, Guillemot F, Serup P, Madsen OD (2000). Control of endodermal endocrine development by Hes-1. *Nat Genet*. **24**:36-44.
- Jeong Y, Leskow FC, El-Jaick K, Roessler E, Muenke M, Yocum A, Dubourg C, Li X, Geng X, Oliver G, et al. (2008). Regulation of a remote Shh forebrain enhancer by the Six3 homeoprotein. *Nat Genet*. **40**:1348-1353.
- Johansson KA, Dursun U, Jordan N, Gu G, Beermann F, Gradwohl G, Grapin-Botton A (2007). Temporal control of neurogenin3 activity in pancreas progenitors reveals competence windows for the generation of different endocrine cell types. *Dev Cell*. **12**:457-65.
- Jonsson J, Carlsson L, Edlund T, Edlund H (1994). Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* **371**:606-609.
- Jonsson J, Carlsson L, Edlund T, Edlund H (1994). Insulinpromoter- factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* **371**:606-609.
- Jorgensen MC, Ahnfelt-Ronne J, Hald J, Madsen OD, Serup P, et al. (2007). An illustrated review of early pancreas development in the mouse. *Endocr Rev*. **28**:685-705.
- Jowett T, Letice L (1994). Whole-mount in situ hybridizations on zebrafish embryos using a mixture of digoxigenin- and fluorescein-labelled probes. *Trends Genet* **10**(3): 73-74.
- Kadison A, Kim J, Maldonado T, Crisera C, Prasad K, Manna P, Preuett B, Hembree M, Longaker M, Gittes G (2001). Retinoid signaling directs secondary lineage selection in pancreatic organogenesis. *J Pediatr Surg*. **36**:1150-1156.
- Kanai F, Marignani PA, Sarbassova D, Yagi R, Hall RA, Donowitz M, et al. (2000). TAZ: a novel transcriptional co-activator regulated by interactions with 14-3-3 and PDZ domain proteins. *EMBO Journal* **19**:6778-6791.
- Kango-Singh M, Singh A (2009). "Regulation of organ size: Insights from the Drosophila Hippo signaling pathway". *Dev Dyn*. **238**(7):1627-1637.
- Kawaguchi Y, Cooper B, Gannon M, Ray M, MacDonald RJ, Wright CV (2002). The role of the transcriptional regulator Ptf1a in converting intestinal to pancreatic progenitors. *Nat Genet*. **32**:128-134.
- Kawakami K, Shima A, Kawakami N (2000). Identification of a functional transposase of the Tol2 element, an Ac-like element from the Japanese medaka fish, and its transposition in the zebrafish germ lineage. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**:11403-11408.
- Kawakami K, Shima A, Kawakami N (2000). Identification of a functional transposase of the Tol2 element, an Ac-like element from the Japanese medaka fish, and its transposition in the zebrafish germ lineage. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**:11403-11408.

- Kengaku M, Okamoto H (1995). bFGF as a possible morphogen for the anteroposterior axis of the central nervous system in *Xenopus*. *Development* **121**:3121-3130.
- Khoury G, Gruss P (1983). Enhancer elements. *Cell* **33**(2):313-314.
- Kinkel MD, Eames SC, Alonzo MR, Prince VE (2008). Cdx4 is required in the endoderm to localize the pancreas and limit beta-cell number. *Development* **135**:919-929.
- Klein G (1993). Oncogenes. *Cancer Medicine, 3rd ed.* Eds. Holland, J.F. et al. Lea & Febiger: 65-77.
- Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG (1993). Structural biochemistry and activation of matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Bio.* **5**:891-897.
- Knight RD, Schilling TF (2006). Cranial neural crest and development of the head skeleton *Adv Exp Med Biol.* **589**:120-33.
- Kobayashi H, Spilde TL, Bhatia AM, Buckingham RB, Hembree MJ, Prasad K, Preuett BL, Imamura M, Gittes GK (2002). Retinoid signaling controls mouse pancreatic exocrine lineage selection through epithelial-mesenchymal interactions. *Gastroenterology* **123**:1331-1340.
- Kontges G, Lumsden A (1996). Rhombencephalic neuralcrest segmentation is preserved throughout craniofacial ontogeny. *Development* **122**:3229-3242.
- Krapp A, Knofler M, Frutiger S, Hughes GJ, Hagenbuchle O, Wellauer PK (1996). The p48 DNA-binding subunit of transcription factor PTF1 is a new exocrine pancreas-specific basic helix-loop-helix protein. *Embo J.* **15**:4317-4329.
- Krapp A, Knofler M, Ledermann B, Burki K, Berney C, Zoerkler N, Hagenbuchle O, Wellauer PK (1998). The bHLH protein PTF1-p48 is essential for the formation of the exocrine and the correct spatial organization of the endocrine pancreas. *Genes Dev.* **12**:3752-3763.
- Krapp A, Knofler M, Ledermann B, Burki K, Berney C, Zoerkler N, Hagenbuchle O, Wellauer PK (1998). The bHLH protein PTF1-p48 is essential for the formation of the exocrine and the correct spatial organization of the endocrine pancreas. *Genes Dev.* **12**:3752-63.
- Kraus WL, Wong J (2002). Nuclear receptor-dependent transcription with chromatin. Is it all about enzymes? *Eur J Biochem.* **269**:2275-2283.
- Kries TE, Vale RD (1993). Guidebook to cytoskeletal & motor proteins. *Oxford University Press.*
- Kroon E, Martinson LA, Kadoya K, Bang AG, Kelly OG, Eliazar S, Young H, Richardson M, Smart NG, Cunningham J, Agulnick AD, D'Amour KA, Carpenter MK, Baetge EE (2008). Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. *Nat Biotechnol.* **26**(4):443-452.
- Lammert E, Cleaver O, Melton D (2001). Induction of pancreatic differentiation by signals from blood vessels. *Science* **294**:564-567.

- Lango Allen H, Flanagan SE, Shaw-Smith C, De Franco E, Akerman I, Caswell R; International Pancreatic Agenesis Consortium, Ferrer J, Hattersley AT, Ellard S, et al. (2011). GATA6 haploinsufficiency causes pancreatic agenesis in humans. *Nat Genet.* **44**(1):20-22.
- Latchman DS (1993). Transcription factors. *IRL Press, New York.*
- Lee Kp, Lee JH, Kim TS, Kim TH, Park HD, Byun JS, Kim MC, Jeong WI, Calvisi DF, Kim JM y cols., (2010). The Hippo-Salvador pathway restrains hepatic oval cell proliferation, liver size, and liver tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**:8248-8253.
- Lee YC, Damholt AB, Billestrup N, Kisbye T, Galante P, Michelsen B, Kofod H, Nielsen JH (1999). Developmental expression of proprotein convertase 1/3 in the rat. *Mol Cell Endocrinol.* **155**:27-35.
- Lettice LA, Horikoshi T, Heaney SJH, van Baren MJ, van der Linde HC, Breedveld GJ, Joosse M, Akarsu N, Oostra BA, Endo N, et al. (2002). Disruption of a long-range cis-acting regulator for Shh causes preaxial polydactyly. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**:7548-7553.
- Liu GY, Luo Q, Xiong B, Pan C, Yin P, Liao HF, et al. (2008). Tissue array for Tp53, C-myc, CCND1 gene overexpression in different tumors. *World J Gastroenterol.* **14**(47):7199-7207.
- Liu YC, Li F, Handler J, Huang CRL, Xiang Y, Neretti N, et al. (2008). Global regulation of nucleotide biosynthetic genes by c-Myc. *PLoS ONE* **3**(7):e2722.
- Lokmane L, Haumaitre C, Garcia-Villalba P, Anselm, I, Schneider-Maunoury S, Cereghini S (2008). Crucial role of vHNF1 in vertebrate hepatic specification. *Development* **135**:2777-2786.
- Lu L, Li Y, Kim SM, Bossuyt W, Liu P, Qiu Q, Wang Y, Halder G, Finegold MJ, Lee JS. Y cols., (2010). Hippo signaling is a potent in vivo growth and tumor suppressor pathway in the mammalian liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**:1437-1442.
- Ludwig KU, Mangold E, Herms S, Nowak S, Reutter H, Paul A, Becker J, Herberz R, AlChawa T, Nasser E, Böhmer AC, Mattheisen M, Alblas MA, Barth S, Kluck N, Lauster C, Braumann B, Reich RH, Hemprich A, Pötzsch S, Blaumeiser B, Daratsianos N, Kreusch T, Murray JC, Marazita ML, Ruczinski I, Scott AF, Beaty TH, Kramer FJ, Wienker TF, Steegers-Theunissen RP, Rubini M, Mossey PA, Hoffmann P, Lange C, Cichon S, Propping P, Knapp M, Nöthen MM (2012). Genome-wide meta-analyses of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate identify six new risk loci. *Nat Genet.* **44**(9):968-71.
- Luijten M, van Beelen VA, Verhoef A, Renkens MF, van Herwijnen MH, Westerman A, van Schooten FJ, Pennings JL, Piersma AH (2010). Transcriptomics analysis of retinoic acid embryotoxicity in rat postimplantation whole embryo culture. *Reprod Toxicol.* **30**(2):333-40.
- Maden M (2007). Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**:755–765.

- Manfroid I, Delporte F, Baudhuin A, Motte P, Neumann CJ, Voz ML, Martial JA, Peers B (2007). Reciprocal endoderm-mesoderm interactions mediated by fgf24 and fgf10 govern pancreas development. *Development*. **134**:4011-4021.
- Marcu K, Bossone S y Patel A (1992). Myc function and regulation. *Annu Rev Biochem*. **61**:809-860.
- Mark M, Ghyselinck NB, Chambon P (2004). Retinoic acid signalling in the development of branchial arches. *Curr. Opin. Genet. Dev*. **14**:591–598.
- Mark M, Ghyselinck NB, Chambon P (2009). Function of retinoic acid receptors during embryonic development. *Nucl Recept Signal* **7**:e002.
- Martin CC, Oeser JK, O'Brien RM (2004). Differential regulation of islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein gene transcription by Pax-6 and Pdx-1. *J Biol Chem*. **279**:34277-34289
- Martin D, Pantoja C, Fernández Miñán A, Valdes-Quezada C, Moltó E, Matesanz F, Bogdanović O, de la Calle-Mustienes E, Domínguez O, Taher L, et al. (2011). Genome-wide CTCF distribution in vertebrates defines equivalent sites that aid the identification of disease-associated genes. *Nat Struct Mol Biol*. **18**:708-714.
- Masui T, Long Q, Beres TM, Magnuson MA, MacDonald RJ (2007). Early pancreatic development requires the vertebrate Suppressor of Hairless (RBPJ) in the PTF1 bHLH complex. *Genes Dev*. **21**:2629-2643.
- Matrisian LM, Hogan BLM (1990). Growth factor regulated proteases and extracellular matrix remodeling during mammalian Development *Curr Top Dev Bio*. **24**:219-259.
- McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW (1999). Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev*. **20**:321-344.
- McLin VA, Rankin SA, Zorn AM (2007). Repression of Wnt/beta-catenin signaling in the anterior endoderm is essential for liver and pancreas development. *Development* **134**:2207-2217.
- Medical Embryology Langman **9th edition** (2003).
- Meijer AH, van der Sar AM, Cunha C, Lamers GE, Laplante MA, Kikuta H, Bitter W, Becker TS, Spaik HP (2008). Identification and real-time imaging of a myc-expressing neutrophil population involved in inflammation and mycobacterial granuloma formation in zebrafish. *Dev Comp Immunol*. **32**(1):36-49.
- Meijera A, van der Sarb A, Cunhaa C, Lamersa G, Laplantec M, Kikutac H, Bitterb W, Beckerc T, Spainka H (2008). Identification and real-time imaging of a myc-expressing neutrophil population involved in inflammation and mycobacterial granuloma formation in zebrafish. *Developmental and Comparative Immunology* **32**:36–49.
- Metivier R, Reid G, Gannon F (2006). Transcription in four dimensions: nuclear receptor-directed initiation of gene expression. *EMBO Rep*. **7**(2):161-167.

- Mikkelsen TS, Ku M, Jaffe DB, Issac B, Lieberman E, Giannoukos G, Alvarez P, Brockman W, Kim TK, Koche RP, Lee W, Mendenhall E, O'Donovan A, Presser A, Russ C, Xie X, Meissner A, Wernig M, Jaenisch R, Nusbaum C, Lander ES, Bernstein BE (2007). Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature* **448**(7153):553-560.
- Moltó E, Fernández A, Montoliu L (2009). Boundaries in vertebrate genomes: different solutions to adequately insulate gene expression domains. *Brief Funct Genomic Proteomic*. **8**:283-296.
- Morrish F, Isern N, Sadilek M, Jeffrey M, Hockenbery DM (2009). c-Myc activates multiple metabolic networks to generate substrates for cell-cycle entry. *Oncogene*. **28**(27):2485-2491.
- Muenke M, Schell U, Hehr A, Robin NH, Losken HW, Schinzel A Pulleyn LJ, Rutland P, Reardon W, Malcolm S (1994). A common mutation in the fibroblast growth factor receptor 1 gene in Pfeiffer syndrome. *Nature Genet*. **8**:269-274.
- Niederreither K, Vermot J, Le Roux I, Schuhbaur B, Chambon P y Dollé P (2003). The regional pattern of retinoic acid synthesis by RALDH2 is essential for the development of posterior pharyngeal arches and the enteric nervous system. *Development* **130**(11): 2525-2534.
- Nobrega MA, Ovcharenko I, Afzal V, Rubin EM (2003). Scanning human gene deserts for long-range enhancers. *Science* **302**:413.
- Noel ES, Casal-Sueiro A, Busch-Nentwich E, Verkade H, Dong PD, Stemple DL, Ober EA (2008). Organ-specific requirements for Hdac1 in liver and páncreas formation. *Dev Biol*. **322**: 237-250.
- Noordermeer D, Leleu M, Splinter E, Rougemont J, De Laat W, Duboule D (2011). The dynamic architecture of Hox gene clusters. *Science* **334**(6053):222-225.
- Offield MF, Jetton TL, Labosky PA, Ray M, Stein RW, Magnuson MA, Hogan BL, Wright CV (1996). PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development* **122**:983-995.
- Offield MF, Jetton TL, Labosky PA, Ray M, Stein RW, Magnuson MA, Hogan BL, Wright CV (1996). PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development* **122**(3):983-995.
- Ohlsson H, Karlsson K, Edlund T (1993). IPF1, a homeodomain-containing transactivator of the insulin gene. *Embo J*. **12**:4251-4259.
- Oster SK, Marhin WW, Asker C, Facchini LM, Dion PA, et al. (2000). Myc is an essential negative regulator of platelet-derived growth factor beta receptor expression. *Mol Cell Biol* **20**: 6768–6778.
- Ostrom M, Loffler KA, Edfalk S, Selander L, Dahl U, Ricordi C, Jeon J, Correa-Medina M, Diez J, Edlund H (2008). Retinoic acid promotes the generation of pancreatic endocrine progenitor cells and their further differentiation into beta-cells. *PLoS ONE* **3**:e2841.

- Ota M, Sasaki H (2008). Mammalian Tead proteins regulate cell proliferation and contact inhibition as transcriptional mediators of Hippo signaling. *Development* **135**(24):4059-4069.
- Packham G, Cleveland JL (1994). Ornithine decarboxylase is a mediator of c-Myc-induced apoptosis. *Mol Cell Biol.* **14**:5741-5747.
- Pan FC, Wright C (2011). Pancreas organogenesis: from bud to plexus to gland. *Dev Dyn.* **240**:530-565.
- Pang K, Mukonoweshuro C, Wong GG (1994). Beta cells arise from glucose transporter type 2 (Glut2)-expressing epithelial cells of the developing rat pancreas. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**:9559-9563.
- Pauls S, Zecchin E, Tiso N, Bortolussi M, Argenton F (2007). Function and regulation of zebrafish nkx2.2a during development of pancreatic islet and ducts. *Dev Biol.* **304**:875-890.
- Pauls S, Zecchin E, Tiso N, Bortolussi M, Argenton F (2007). Function and regulation of zebrafish nkx2.2a during development of pancreatic islet and ducts. *Dev Biol.* **304**:875-890.
- Pennacchio LA, Ahituv N, Moses AM, Prabhakar S, Nobrega MA, Shoukry M, Minovitsky S, Dubchak I, Holt A, Lewis KD, Plajzer-Frick I, Akiyama J, De Val S, Afzal V, Black BL, Couronne O, Eisen MB, Visel A, Rubin EM (2006). In vivo enhancer analysis of human conserved non-coding sequences. *Nature* **444**: 499-502.
- Pennacchio LA, Rubin EM (2001). Genomic strategies to identify mammalian regulatory sequences. *Nat Rev Genet.* **2**:100-109.
- Phillips-Cremens JE, Corces VG (2013). Chromatin insulators: linking genome organization to cellular function. *Mol Cell.* **50**(4):461-74.
- Pictet RL, Clarke WR, Williams RH, Rutter WJ (1972). An ultrastructural analysis of the developing embryonic pancreas. *Dev Biol.* **29**:436-467.
- Pigot R, Power C (1993). The Adhesion Molecule Facts Book. *Academic Press, New York*.
- Piotrowski T, Nüsslein-Volhard C (2000). The endoderm plays an important role in patterning the segmented pharyngeal region in zebrafish (*Danio rerio*). *Dev Biol.* **15**;225(2):339-56.
- Piotrowski T, Nüsslein-Volhard C (2000). The endoderm plays an important role in patterning the segmented pharyngeal region in zebrafish (*Danio rerio*). *Dev Biol.* **225**(2):339-56.
- Piper K, Ball SG, Keeling JW, Mansoor S, Wilson DI, Hanley NA (2002). Novel SOX9 expression during human pancreas development correlates to abnormalities in Campomelic dysplasia. *Mech Dev.* **116**(1-2):223-226.

- Rada-Iglesias A, Bajpai R, Swigut T, Brugmann SA, Flynn RA, Wysocka J (2011). A unique chromatin signature uncovers early developmental enhancers in humans. *Nature* **470**: 279-283.
- Ragvin A, Moro E, Fredman D, Navratilova P, Drivenes Ø, Engström PG, Alonso ME, de la Calle Mustienes E, Gómez Skarmeta JL, Tavares MJ y cols. (2010). Long-range gene regulation links genomic type 2 diabetes and obesity risk regions to HHEX, SOX4, and IRX3. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**:775-780.
- Raum JC, Gerrish K, Artner I, Henderson E, Guo M, Sussel L, Schisler JC, Newgard CB, Stein R (2006). FoxA2, Nkx2.2, and PDX-1 regulate islet beta-cell-specific mafA expression through conserved sequences located between base pairs -8118 and -7750 upstream from the transcription start site. *Mol Cell Biol.* **26**:5735-5743.
- Recillas-Targa F, Pikaart MJ, Burgess-Beusse B, Bell AC, Litt MD, West AG, Gaszner M, Felsenfeld G (2002). Position-effect protection and enhancer blocking by the chicken beta-globin insulator are separable activities. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 6883-6888.
- Reiter JF, Kikuchi Y, Stainier DY (2001). Multiple roles for Gata5 in zebrafish endoderm formation. *Development* **128**(1):125-135.
- Rodríguez-Seguí S, Cho C, Luengo M, Cebola I, Rovira M, Bessa J, Berry A, Maestro M, Jennings R, Pasquali L, Morán I, Castro N, Hanley NA, Gomez-Skarmeta JL, Vallier L, Ferrer J (2014). TEAD and YAP regulate the enhancer network of human embryonic pancreatic progenitors. Submitted to *Nature Cell Biol.*
- Rossi JM, Dunn NR, Hogan BL, Zaret KS (2001). Distinct mesodermal signals, including BMPs from the septum transversum mesenchyme, are required in combination for hepatogenesis from the endoderm. *Genes Dev.* **15**:1998-2009.
- Rozen S, Skaletsky H (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol.* **132**:365-86.
- Rudert F, Gronemeyer H (1993). Retinoic acid-response elements with a highly repetitive structure isolated by immuno-selection from genomic DNA. *J Steroid Biochem Mol Biol.* **46**(2):121-33.
- Sakabe NJ, Nobrega MA (2010). Genome-wide maps of transcription regulatory elements. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* **2**(4):422-37.
- Sander M, Sussel L, Connors J, Scheel D, Kalamaras J, Dela Cruz F, et al (2000). Homeobox gene Nkx6.1 lies downstream of Nkx2.2 in the major pathway of betacell formation in the pancreas. *Development* **127**:5533-5540.
- Schmidt EV (2004). The role of c-myc in regulation of translation initiation. *Oncogene* **23**(18):3217-21.
- Seymour PA, Freude KK, Tran MN, Mayes EE, Jensen J, Kist R, et al (2007). SOX9 is required for maintenance of the pancreatic progenitor cell pool. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**:1865-1870.

- Seymour PA, Freude KK, Tran MN, Mayes EE, Jensen J, Kist R, Scherer G, Sander M (2007). SOX9 is required for maintenance of the pancreatic progenitor cell pool. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**(6):1865-1870.
- Sheiness D, Fanshier L y Bishop JM (1978). Identification of nucleotide sequences which may encode the oncogenic capacity of avian retrovirus MC29. *J Virol.* **28** (2):600-610.
- Shim H, Dolde C, Lewis BC, Wu CS, Dang G, Jungmann RA, Dalla-Favera R, Dang CV (1997). c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**:6658-6663.
- Shin D, Shin CH, Tucker J, Ober EA, Rentzsch F, Poss KD, Hammerschmidt M, Mullins MC, Stainier DY (2007). Bmp and Fgf signaling are essential for liver specification in zebrafish. *Development* **134**:2041-2050.
- Skouloudaki K, Puetz M, Simons M, Courbard JR, Boehlke C, Hartleben B, Engel C, Moeller MJ, Englert C, Bollig F, Schäfer T, Ramachandran H, Mlodzik M, Huber TB, Kuehn EW, Kim E, Kramer-Zucker A, Walz G (2009). Scribble participates in Hippo signaling and is required for normal zebrafish pronephros development. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**(21):8579-8584.
- Skouloudaki K, Puetz M, Simons M, Courbard JR, Boehlke C, Hartleben B, Engel C, Moeller MJ, Englert C, Bollig F, Schäfer T, Ramachandran H, Mlodzik M, Huber TB, Kuehn EW, Kim E, Kramer-Zucker A, Walz G (2009). Scribble participates in Hippo signaling and is required for normal zebrafish pronephros development. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**(21):8579-8584.
- Slack JMW (1995). Developmental biology of the pancreas. *Development* **121**:1569-1580.
- Smale ST y Baltimore D (1989). The “initiator” as a transcription control element. *Cell* **57**:103-113.
- Smith SB, Watada H, Scheel DW, Mrejen C, German MS (2000). Autoregulation and maturity onset diabetes of the young transcription factors control the human PAX4 promoter. *J Biol Chem.* **275**:36910-3699.
- Solomon DLC, Amati B y Land H (1993). Distinct DNA binding preferences for the c-Myc/Max and Max/Max dimers. *Nucleic Acids Res.* **21**(23): 5572-5576.
- Song H, Mak KK, Topol L, Yun K, Hu J, Garrett L, Chen Y, Park O, Chang J, Simpson RM. Y cols., (2010). Mammalian Mst1 and Mst2 kinases play essential roles in organ size control and tumor suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**:1431-1436.
- Sosa-Pineda B, Chowdhury K, Torres M, Oliver G, Gruss P (1997). The Pax4 gene is essential for differentiation of insulin-producing beta cells in the mammalian pancreas. *Nature* **386**:399-402.
- Sotelo J, Esposito D, Duhagon MA, Banfield K, Mehalko J, Liao H, Stephens RM, Harris TJ, Munroe DJ, Wu X (2010). Long-range enhancers on 8q24 regulate c-Myc. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**(7):3001-3005.

- Spagnoli FM, Brivanlou AH (2008). The Gata5 target, TGIF2, defines the pancreatic region by modulating BMP signals within the endoderm. *Development* **135**:451-461.
- Spencer CA y Groudine M (1991). Control of c-myc regulation in normal and neoplastic cells. *Adv Cancer Res.* **56**:1-48.
- Spitz F, Gonzalez F, Duboule D (2003). A global control region defines a chromosomal regulatory landscape containing the HoxD cluster. *Cell* **113**:405-417.
- Splinter E, de Wit E, van de Werken HJ, Klous P, de Laat W (2012). Determining long-range chromatin interactions for selected genomic sites using 4C-seq technology: from fixation to computation. *Methods* **58**(3):221-230.
- Spooner BS, Walther BT, Rutter WJ (1970). The development of the dorsal and ventral mammalian pancreas in vivo and in vitro. *J Cell Biol.* **47**:235-246.
- St-Onge L, Sosa-Pineda B, Chowdhury K, Mansouri A, Gruss P (1997). Pax6 is required for differentiation of glucagon-producing alpha-cells in mouse pancreas. *Nature* **387**:406-409.
- Stafford D, Hornbruch A, Mueller PR, Prince VE (2004). A conserved role for retinoid signaling in vertebrate pancreas development. *Dev Genes Evol.* **214**:432-441.
- Stafford D, Prince VE (2002). Retinoic acid signaling is required for a critical early step in zebrafish pancreatic development. *Curr Biol.* **12**:1215-1220.
- Stafford D, White RJ, Kinkel MD, Linville A, Schilling TF, Prince VE (2006). Retinoids signal directly to zebrafish endoderm to specify insulin-expressing beta-cells. *Development.* **133**:949-956.
- Stafford D, White RJ, Kinkel MD, Linville A, Schilling TF, Prince VE (2006). Retinoids signal directly to zebrafish endoderm to specify insulin-expressing beta-cells. *Development* **133**:949-956.
- Steinhardt AA, Gayyed MF, Klein AP, Dong J, Maitra A, Pan D, Montgomery EA, Anders RA (2008). "Expression of Yes-associated protein in common solid tumors". *Human Pathology* **39**(11):1582-1589.
- Stelzner A (1987). Oncogenes and Growth Control. *Berlin/ Heidelberg/ NewYork/ London/ Paris/ Tokyo. Springer-Verlag*: 9-35.
- Stoffers DA, Ferrer J, Clarke WL, Habener JF (1997). Early-onset type-II diabetes mellitus (MODY4) linked to IPF1. *Nat Genet.* **17**:138-139.
- Stoffers DA, Stanojevic V, Habener JF (1998). Insulin promoter factor-1 gene mutation linked to early-onset type 2 diabetes mellitus directs expression of a dominant negative isoprotein. *J Clin Invest.* **102**:232-241.
- Stoffers DA, Zinkin NT, Stanojevic V, Clarke WL, Habener JF (1997). Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human IPF1 gene coding sequence. *Nat Genet.* **15**(1):106-110.

- Tiso N, Filippi A, Pauls S, Bortolussi M, Argenton F (2002). BMP signalling regulates anteroposterior endoderm patterning in zebrafish. *Mech Dev.* **118**:29-37.
- Trainor P y Krumlauf R (2000). Plasticity in mouse neural crest cells reveals a new patterning role for cranial mesoderm. *Nat Cell Bio.* **2**:96-102.
- Tucker AS y Sharpe PT (1999). Molecular genetics of tooth morphogenesis and patterning: the right shape in the right place. *J Dent Res.* **78**: 826-834.
- Tulachan SS, Doi R, Kawaguchi Y, Tsuji S, Nakajima S, Masui T, Koizumi M, Toyoda E, Mori T, Ito D, et al. (2003). All-trans retinoic acid induces differentiation of ducts and endocrine cells by mesenchymal/epithelial interactions in embryonic pancreas. *Diabetes* **52**:76-84.
- Turque N, Plaza S, Radvanyi F, Carriere C, Saule S (1994). Pax-QNR/Pax-6, a paired box-and homeoboxcontaining gene expressed in neurons, is also expressed in pancreatic endocrine cells. *Mol Endocrinol.* **8**:929-938.
- Udan RS, Kango-Singh M, Nolo R, Tao C, Halder G (2003). Hippo promotes proliferation arrest and apoptosis in the Salvador/Warts pathway. *Nat. Cell Biol.* **5**:914-920.
- Udan RS, Kango-Singh M, Nolo R, Tao C, Halder G (2003). Hippo promotes proliferation arrest and apoptosis in the Salvador/Warts pathway. *Nat Cell Biol.* **5**(10):914-920.
- Valera A, Pujol A, Gregori X, Riu E, Visa J, Bosch F (1995). Evidence from transgenic mice that myc regulates hepatic glycolysis. *FASEB J.* **9**:1067-1078.
- Veitch E, Begbie J, Schilling TF, Smith MM, Graham A (1999). Pharyngeal arch patterning in the absence of neural crest. *Curr Biol.* **9**:1481-1484.
- Visel A, Blow MJ, Li Z, Zhang T, Akiyama JA, Holt A, Plajzer-Frick I, Shoukry M, Wright C, Chen F, et al. (2009). ChIP-seq accurately predicts tissue-specific activity of enhancers. *Nature* **457**:854–858.
- Visel A, Bristow J, Pennacchio LA (2007). Enhancer identification through comparative genomics. *Semin Cell Dev Biol.* **18**:140-152.
- Visel A, Prabhakar S, Akiyama JA, Shoukry M, Lewis KD, Holt A, Plajzer-Frick I, Afzal V, Rubin EM, Pennacchio LA (2008). Ultraconservation identifies a small subset of extreme constrained developmental enhancers. *Nat Genet.* **40**:158-160.
- Visel A, Zhu Y, May D, Afzal V, Gong E, Attanasio C, Blow MJ, Cohen JC, Rubin EM, Pennacchio LA (2010). Targeted deletion of the 9p21 non-coding coronary artery disease risk interval in mice. *Nature* **464**:409-412.
- Wang J, Elghazi L, Parker SE, Kizilocak H, Asano M, Sussel L, Sosa-Pineda B (2004). The concerted activities of Pax4 and Nkx2.2 are essential to initiate pancreatic beta-cell differentiation. *Dev Biol.* **266**:178-189.
- Wang J, Kilic G, Aydin M, Burke Z, Oliver G, Sosa-Pineda B (2005). Prox1 activity controls páncreas morphogenesis and participates in the production of “secondary transition” pancreatic endocrine cells. *Dev Biol.* **286**:182-194.

- Wang Q, Elghazi L, Martin S, Martins I, Srinivasan RS, Geng X, Sleeman M, Collombat P, Houghton J, Sosa-Pineda B (2008). Ghrelin is a novel target of Pax4 in endocrine progenitors of the pancreas and duodenum. *Dev Dyn*. **237**:51-61.
- Wendik B, Maier E, Meyer D (2004). Zebrafish *mnx* genes in endocrine and exocrine pancreas formation. *Dev Biol*. **268**:372-383.
- Wendling O, Dennefeld C, Chambon P y Mark M (2000). Retinoid signaling is essential for patterning the endoderm of the third and fourth pharyngeal arches. *Development* **127**:1553-1562.
- West AG, Gaszner M, Felsenfeld G (2002). Insulators: many functions, many mechanisms. *Genes Dev*. **16**:271-288.
- Wilson JG, Roth CB, Warkany J (1953). An analysis of the syndrome of malformations induced by maternal vitamin A deficiency. Effects of restoration of vitamin A at various times during gestation. *Am J Anat*. **92**(2):189-217.
- Wilson ME, Kalamaras JA, German MS (2002). Expression pattern of IAPP and prohormone convertase 1/3 reveals a distinctive set of endocrine cells in the embryonic pancreas. *Mech Dev*. **115**:171-176.
- Wu KL, Gannon M, Peshavaria M, Offield MF, Henderson E, Ray M, Marks A, Gamer LW, Wright CV, Stein R (1997). Hepatocyte nuclear factor 3beta is involved in pancreatic beta-cell-specific transcription of the *pdx-1* gene. *Mol Cell Biol*. **17**:6002-6013.
- Wu S, Liu Y, Zheng Y, Dong J, Pan D (2008). The TEAD/TEF family protein Scalloped mediates transcriptional output of the Hippo growth-regulatory pathway. *Dev Cell*. **14**:388-398.
- Xu Y, Stamenkovic I, Yu Q (2010). CD44 attenuates activation of the hippo signaling pathway and is a prime therapeutic target for glioblastoma. *Cancer Res*. **70**:2455-2464.
- Xuan S, Borok MJ, Decker KJ, Battle MA, Duncan SA, Hale MA, Macdonald RJ, Sussel L (2012). Pancreas-specific deletion of mouse *Gata4* and *Gata6* causes pancreatic agenesis. *J Clin Invest*. **122**(10):3516-3528.
- Yakut T, Egeli U, Gebitekin C (2003). Investigation of c-myc and p53 gene alterations in the tumor and surgical borderline tissues of NSCLC and effects on clinicopathologic behavior: by the FISH technique. *Lung* **181**(5):245-58.
- Yee NS, Lorent K, Pack M (2005). Exocrine pancreas development in zebrafish. *Dev Biol*. **284**: 84-101.
- Yokoyama T, Osada H, Murakami H, Tatematsu Y, Taniguchi T, Kondo Y, Yatabe Y, Hasegawa Y, Shimokata K, Horio Y, et al. (2008). YAP1 is involved in mesothelioma development and negatively regulated by Merlin through phosphorylation. *Carcinogenesis* **29**:2139-2146.

- Yoshitomi H, Zaret KS (2004). Endothelial cell interactions initiate dorsal pancreas development by selectively inducing the transcription factor Ptf1a. *Development*. **21**:21.
- Yu J, Zheng Y, Dong J, Klusza S, Deng WM, Pan D (2010). Kibra functions as a tumor suppressor protein that regulates hippo signaling in conjunction with Merlin and expanded. *Dev Cell*. **18**:288-299.
- Zaret KS, Grompe M (2008). Generation and Regeneration of Cells of the Liver and Pancreas. *Science* **322**:1490-1494.
- Zecchin E, Filippi A, Biemar F, Tiso N, Pauls S, Ellertsdottir E, Gnugge L, Bortolussi M, Driever W, Argenton F (2007). Distinct delta and jagged genes control sequential segregation of pancreatic cell types from precursor pools in zebrafish. *Dev Biol*. **301**:192-204.
- Zecchin E, Mavropoulos A, Devos N, Filippi A, Tiso N, Meyer D, Peers B, Bortolussi M, Argenton F (2004). Evolutionary conserved role of ptf1a in the specification of exocrine pancreatic fates. *Dev Biol*. **268**:174-184.
- Zeller KI, Zhao X, Lee CWH, Chiu KP, Yao F, Yustein JT, et al. (2006). Global mapping of c-Myc binding sites and target gene networks in human B cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**(47):17834-17839.
- Zender L, Spector M, Xue W, Flemming P, Cordon-Cardo C, Silke J, Fan ST, Luk JM et al. (2006). "Identification and Validation of Oncogenes in Liver Cancer Using an Integrative Oncogenomic Approach". *Cell* **125**(7):1253-1267.
- Zhang L, Ren F, Zhang Q, Chen Y, Wang B, Jiang J (2008). The TEAD/TEF family of transcription factor Scalloped mediates Hippo signaling in organ size control. *Dev Cell*. **14**:377-387.
- Zhang W, Yatskevych TA, Baker RK, Antin PB (2004). Regulation of Hex gene expression and initial stages of avian hepatogenesis by Bmp and Fgf signaling. *Dev Biol*. **268**:312-226.
- Zhao B, Ye X, Yu J, Li L, Li W, Li S, Lin JD, Wang CY, Chinnaiyan AM, Lai ZC, et al. (2008). TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control. *Genes & Dev* **22**:1962- 1971.
- Zhou D, Conrad C, Xia F, Park JS, Payer B, Yin Y, Lauwers GY, Thasler W, Lee JT, Avruch J y cols., (2009). Mst1 and Mst2 maintain hepatocyte quiescence and suppress hepatocellular carcinoma development through inactivation of the Yap1 oncogene. *Cancer Cell* **16**:425-438.

